

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66737 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 16/18, A61K 39/395, 38/03, A61P 35/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01912
- (22) 国際出願日: 2001年3月12日 (12.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
09/523,095 2000年3月10日 (10.03.2000) US
特願2000-115246 2000年4月17日 (17.04.2000) JP
特願2000-321822 2000年10月20日 (20.10.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福島直 (FUKUSHIMA, Naoshi) [JP/JP]. 土屋政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]. 大枝匡義 (OH-EDA, Masayoshi) [JP/JP]. 宇野慎介 (UNO, Shinsuke) [JP/JP]. 菊地康文 (KIKUCHI, Yasufumi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 高木千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: POLYPEPTIDE INDUCING APOPTOSIS

(54) 発明の名称: アポトーシスを誘起するポリペプチド

(57) Abstract: A reconstituted polypeptide characterized by inducing apoptosis in nuclear blood cells having integrin associated protein (IAP) without causing the agglutination of erythrocytes. This reconstituted polypeptide contains at least two H chain V domains and at least two L chain V domains of a monoclonal antibody which induces apoptosis in nuclear blood cells having IAP. This reconstituted polypeptide is useful as a remedy for blood diseases such as leukemia.

(57) 要約:

本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさない特性を有する、再構成ポリペプチドに関する。この再構成ポリペプチドは、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む。当該再構成ポリペプチドは、白血病等の血液疾患の治療薬として有用である。

WO 01/66737 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

アポトーシスを誘起するポリペプチド

技術分野

- 5 本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさない特性を有する再構成ポリペプチドに関する。さらに詳しくは、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む再構成ポリペプチドに関する。当該再構成ポリペプチドは、白血病等の血液疾患の治療薬として有用である。
- 10

背景技術

- 特願平9-67499号公報は、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、抗原としてマウス Integrin Associated Protein (マウス IAP) を認識する新規モノクローナル抗体の取得を記載している。また、特願平9-67499号公報は、モノクローナル抗体が骨髄系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有することを開示している。
- 15

- WO99/12973は、ヒトの Integrin Associated Protein (以下ヒト IAP とする ; J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993 にアミノ酸配列及び塩基配列が記載 ; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995) を抗原とするモノクローナル抗体であって、当該ヒト IAP を有する有核血液細胞 (骨髄系細胞及びリンパ球) にアポトーシスを誘起させる特性を有するモノクローナル MABL-1 抗体、MABL-2 抗体、これを産生するハイブリドーマ、MABL-1 (FERM BP-6100) 及び MABL-2 (FERM BP-6101) を記載している。
- 20
- 25

特願平11-63557号公報は、ヒト IAP を抗原とするモノクローナル抗体から、ヒト IAP を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有す

る一本鎖のF_v領域を有する一本鎖F_vを得たことを開示している。

しかし、IAPを抗原とするモノクローナル抗体の投与は、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するものの、*in vitro* で赤血球の凝集作用もた
らす。これは、IAPを抗原とするモノクローナル抗体を多量に生体内に投与し
5 た場合、赤血球の凝集という弊害が生じる可能性があることを示唆するものであ
る。

発明の開示

本発明の課題は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞
10 胞にアポトーシスを誘起する特性が向上し、且つ赤血球の凝集が低減されたか又は
は全く生じない再構成ポリペプチドを提供することである。また、本発明の他の
課題は、前記得られた Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血
液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する血液疾患治療薬を提供すること
である。

15 従って、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) に結合し、IAP
を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさない再
構成ポリペプチドに関する。

本発明はまた、改変抗体である再構成ポリペプチドに関する。

改変抗体は、IAP（好ましくはヒトIAP）を有する有核血液細胞にアポト
20 ーシスを誘起するモノクローナル抗体（例えば、MABL-1抗体、MABL-
2抗体など）のL鎖V領域及びH鎖V領域を含み、IAP（好ましくはヒトIAP）
を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさない
再構成ポリペプチドであればいかなるものでもよい。さらに本発明には、この
V領域のアミノ酸配列の一部を改変した再構成ポリペプチドも包含される。

25 本発明はまた、前記再構成ポリペプチドのヒト型化に関するものであり、ヒト
型化再構成ポリペプチドはヒト型化H鎖V領域及び／又はヒト型化L鎖V領域を
含む。詳細には、ヒト型化再構成ポリペプチドは、ヒトモノクローナル抗体L鎖
V領域のフレームワーク領域（FR）とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域

のCDRを含むヒト型化L鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域から構成される。この場合、CDRおよびFRのアミノ酸配列を一部改変（例えば、欠失、置換又は付加）してもよい。

- 5 さらに本発明は、ヒトモノクローナル抗体L鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成る、IAP（好ましくはヒトIAP）を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する再構成ポリペプチドに関する。

- 本発明はまた、上記マウスCDRに相当する、マウス以外の哺乳動物（例えば、
10 ヒト、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）のモノクローナル抗体由来のCDR、又は当該CDRを含有するH鎖V領域及びL鎖V領域を含んで成る、IAP（好ましくはヒトIAP）を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する再構成ポリペプチドに関する。そのようなCDR、H鎖V領域及びL鎖V領域には、例えばトランスジェニックマウス等から作製されたヒトモノクローナル抗体由来のC
15 DR、該CDRを含有するヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域も包含される。

 本発明はまた、前記種々の再構成ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクターを製造する遺伝子工学的方法に関する。

- 本発明はまた、該組換えベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主は、
20 例えばヒト細胞、マウス細胞などの動物細胞、又は大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物である。

 本発明はまた、上記の宿主を培養し、培養物から再構成ポリペプチドを採取することを特徴とする、再構成ポリペプチドの製造方法に関する。

- さらに本発明は、一本鎖Fvを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して
25 該培地中に一本鎖Fvを分泌させ、該培地中で形成された一本鎖Fvのダイマーを精製することを特徴とする一本鎖Fvのダイマーの製造方法に関する。

 本発明はまた、前記得られた Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する再構成ポリペプチドを有効成分として

含有する血液疾患治療薬に関する。本発明の血液疾患治療薬は、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髄腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫（Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫）、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、真性多血症などの血液疾患の治療に有用である。

本発明の再構成ポリペプチドは、好ましくはモノクローナル抗体に由来するH鎖V領域を2つ及びL鎖V領域を2つ含む。当該再構成ポリペプチドの構成としては、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含むポリペプチドとすることができる。該再構成ポリペプチド中において、H鎖およびL鎖のV領域は、1個以上のアミノ酸からなるペプチドリンカーを介して連結されているのが好ましい。これらの再構成ポリペプチドは、モノクローナル抗体の可変領域を含有し、且つ相補性決定領域（complementarity determining region；以下CDRとする）を保存し、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する。

H鎖V領域

本発明において、モノクローナル抗体に由来するH鎖V領域には、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体中のH鎖V領域又はそのH鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したH鎖V領域、好ましくはヒトIAPを認識し、且つIAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体中のH鎖V領域又はそのH鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したH鎖V領域が包含されるが、MABL-1抗体及びMABL-2抗体に由来するH鎖V領域又はそのH鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したH鎖V領域がより好ましい。さらに好ましくは、ヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域である。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、前記マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域に相当するヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域も用いることができる。また、本発明のH鎖V領域には、前記H鎖V領域の断片であって、抗

原結合性を保持する領域も包含される。

L鎖V領域

本発明におけるL鎖V領域には、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体中のL鎖V領域又はそのL鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したL鎖V領域、好ましくはヒトIAPを認識し、且つIAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体中のL鎖V領域又はそのL鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したL鎖V領域が包含されるが、MABL-1抗体及びMABL-2抗体に由来するL鎖V領域又はそのL鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したL鎖V領域がより好ましい。さらに好ましくは、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含むヒト型化L鎖V領域である。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、前記マウスモノクローナル抗体のL鎖V領域に相当するヒトモノクローナル抗体由来のL鎖V領域も用いることができる。また、本発明のL鎖V領域には、前記L鎖V領域の断片であって、抗原結合性を保持する領域も包含される。

相補性決定領域 (CDR)

L鎖及びH鎖の各V領域は抗原結合部位を形成し、L鎖及びH鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された4個のフレームワークと3個の超可変又は相補佐決定領域 (CDR) により連結されている (Kabat, E. A. ら、[Sequences of Proteins of Immunological Interest] US Dept. Health and Human Services, 1983)。

前記4個のフレームワーク領域 (FR) の多くの部分は β -シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成し、CDRは場合により β -シート構造の一部分を形成することもある。3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

これらのCDR領域は、得られた抗体のV領域のアミノ酸配列と既知抗体のV領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、

「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができる。

一本鎖F_v

一本鎖F_vは、モノクローナル抗体に由来する、連結したH鎖V領域及びL鎖V領域を含むポリペプチドのモノマーであり、得られる一本鎖F_vはもとのモノクローナル抗体の可変領域を含有し、相補性決定領域を保存するため、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する（特願平11-63557号公報）。さらに、本発明の一本鎖F_vにおいて、前記可変領域および／またはCDRの一部またはそのアミノ酸配列の一部を改変（例えば、欠失、置換又は付加）することができる。本発明の一本鎖F_vを構成するH鎖V領域及びL鎖V領域は上述したものであり、H鎖V領域とL鎖V領域を直接又はリンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結することができ、その構成としては、[H鎖V領域] - [L鎖V領域]、[L鎖V領域] - [H鎖V領域]のいずれでもよい。本発明においては、これら一本鎖F_vはダイマー、トリマー又はテトラマーを形成させ、本発明の再構成ポリペプチドとすることができる。

一本鎖再構成ポリペプチド

本発明の2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含む一本鎖再構成ポリペプチドは、上述のような2つ以上のH鎖V領域とL鎖V領域をそれぞれ含有する。このポリペプチドにおいて各領域は、該一本鎖再構成ポリペプチドが特定の立体構造、具体的には一本鎖F_vのダイマーが構成する立体構造を模倣し得るよう配置させる必要があり、例えば

[H鎖V領域] - [L鎖V領域] - [H鎖V領域] - [L鎖V領域]

又は

[L鎖V領域] - [H鎖V領域] - [L鎖V領域] - [H鎖V領域]

の順序で各領域が配置され、これらの領域はペプチドリンカーを介して連結される。

リンカー

本発明において、H鎖V領域とL鎖V領域とを連結するリンカーとしては、遺

伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996 に開示されるリンカーを用いることができる。例えば、ペプチドリンカーの場合：

S e r
 5 G l y · S e r
 G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y
 10 G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y
 G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r
 15 S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y
 (G l y · G l y · G l y · G l y · S e r) n
 (S e r · G l y · G l y · G l y · G l y) n

[n は1以上の整数である]を挙げることができる。リンカーペプチドの長さは、通常1～15アミノ酸であるが、好ましくは2～12アミノ酸、より好ましくは
 20 3～10アミノ酸である。これらのリンカーを導入する方法は本発明の再構成ポリペプチドをコードするDNAの構築方法の説明において述べる。

本発明における合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイ

ミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩 (スルホ-DST)、ビス [2- (スクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (BSOCOES)、ビス [2- (スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (スルホ-BSOCOES) などであり、これらの架橋剤は市販されている。

特に、一本鎖F_vのダイマーを形成させる場合、宿主細胞で産生された一本鎖モノマーを培地等の溶液中で、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上ダイマー化するのに適したリンカーを選択することが好ましく、具体的には2~12アミノ酸、より好ましくは3~10アミノ酸、またはこれに相当する他のリンカーが好ましい。

再構成ポリペプチドの製造

ヒトIAPを有する細胞に結合する再構成ポリペプチドは、ヒトIAPに対するモノクローナル抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを前述のリンカーを介して連結することにより得られる。一本鎖F_vの例として、MABL-1抗体に由来するH鎖V領域とL鎖V領域を有するものをMABL1-scF_v、MABL-2抗体に由来するH鎖V領域とL鎖V領域を有するものをMABL2-scF_vとする。

これらの再構成ポリペプチドを製造するにあたり、該ポリペプチドが分泌性であることを所望する場合は、そのN-末端にシグナルペプチドを付加することができる。また、該ポリペプチドの効率的精製のために、ポリペプチド精製において有用である公知の配列、例えばFLAG配列などを挿入することができる。この場合、抗FLAG抗体を用いてポリペプチドを効率よく精製することができる。

本発明の再構成ポリペプチドを作製するためには、再構成ポリペプチドをコードするDNA、即ち一本鎖F_vをコードするDNA又は再構成ポリペプチドモノマーをコードするDNAを得る必要がある。これらのDNAは、すでに詳細に説明したMABL1-scF_v及び／又はMABL2-scF_vのH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを用いて、又はこれらのDNAを鋳型とし、その配列内の所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプ

ライマー対を用いるPCR法により増幅することにより得ることができる。

各V領域について、アミノ酸配列の一部改変を所望する場合には、PCR法を用いる公知の方法によって1又は数個のアミノ酸が改変された、即ち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するV領域を得ることができる。特定の抗原に対して十分に活性がある再構成ポリペプチドを作製するために、PCR法を用いる公知の方法によって前記V領域のアミノ酸配列の一部を改変することが望ましい。

PCRに用いるプライマーを決定するにあたり、前記MABL-1抗体及び/又はMABL-2抗体のH鎖及びL鎖のタイピングをして両鎖の型を決める必要があるが、MABL-1抗体はκ型L鎖及びγ1型のH鎖を有し、MABL-2抗体はκ型L鎖及びγ2a型のH鎖を有することが明らかになっている（特願平11-63557号公報）。前記MABL-1抗体及び/又はMABL-2抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて増幅するには、Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991に記載されているプライマーを用いることができる。

次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いてMABL-1抗体及びMABL-2抗体のL鎖V領域を増幅するため、5'-末端オリゴヌクレオチドプライマー及び3'-末端オリゴヌクレオチドプライマーを上述のように決定する。同様にして、MABL-1抗体のH鎖V領域及びMABL-2抗体のH鎖V領域の増幅のため、それぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーを決定する。

その例として本発明においては、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素HinfI切断部位を提供する配列GATCを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有するものを使用している。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

特に設計されたPCRプライマーを用いて、MABL-1、MABL-2抗体の各V領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な

塩基配列を導入して、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つそれらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした（例えば、本発明ではK o z a k 配列の導入により転写効率を上げるように工夫されている）。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たMABL-1、MABL-2抗体の各V領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター（WO 92/19759参照）に挿入した。クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法、例えば、適当なベクターに挿入し、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystems 社製）を用いて行うことができる。

本発明の再構成ポリペプチドにおいて、リンカー、例えばペプチドリリンカーは次のように導入することができる。即ち、上述のH鎖V領域及びL鎖V領域のためのプライマーと一部相補的な配列を有し、且つ該リンカーのN-末端またはC-末端をコードするようにプライマーを設計し、これを用いてPCRを行うことによって所望のアミノ酸配列および長さを有するペプチドリリンカーをコードするDNAを作成することができる。そして、該DNAを介してH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを連結すれば、所望のペプチドリリンカーを有する本発明の再構成ポリペプチドをコードするDNAを得ることができる。さらに、1つの再構成ポリペプチドをコードするDNAを得ることができれば、前記DNAを鋳型にして、そして種々のリンカー用のプライマーを設計し、これを用いてPCRを実施すれば、所望のペプチドリリンカーを有する再構成ポリペプチド又はリンカーを有さない再構成ポリペプチドをコードするDNAは容易に得ることができる。

また、本発明における再構成ポリペプチドの各鎖V領域は、従来の技術（例えば、Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 851-856 (1993)を参照のこと）を用いることによって、ヒト型化することが可能であり、また一旦ヒト型化Fv領域をコードするDNAが作製されれば、ヒト型化一本鎖Fv、ヒト型化一本鎖Fv断片、ヒト型化モノクローナル抗体あるいはヒト型化モノクローナル抗体断片は、常法に従って容易に作出する事が可能である。さらに、必要な場合、これらのV領域のアミノ酸配列の一部を改変することも可能である。

さらに、遺伝子工学における慣用技術を用いて上述のマウス由来のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAと同様に、これらに相当する他の哺乳動物由来のDNA、例えばヒト由来のDNAを得ることができる。得られたDNAを用いて、他の哺乳動物、特にヒト由来のH鎖V領域及びL鎖V領域、ヒト由来の一本鎖F_v及びその断片、並びにヒト由来のモノクローナル抗体及びその断片を得ることができる。

以上のように、目的とする再構成ポリペプチドの各鎖V領域、ヒト型化再構成ポリペプチドの各鎖V領域をコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。また、常法に従って宿主を培養し、産生した再構成一本鎖F_v、再構成ヒト型化一本鎖F_v、ヒト型化モノクローナル抗体及びヒト型化モノクローナル抗体断片は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。この場合、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法、例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せて、本発明の再構成ポリペプチドを分離・精製することができるが、これらに限定されるものではない。

再構成一本鎖F_vを動物細胞、例えば、COS 7細胞、CHO細胞などの動物培養細胞、好ましくはCHO細胞で産生する場合、無血清培地で該再構成一本鎖F_vを産生させると、培地中で効率よく該一本鎖F_vのダイマーを形成することができる。さらに、該ダイマーを精製する際には、形成されたダイマーを安定的に高収率で回収することができると共に長期間、ダイマーの状態で保存することができる。この場合に用いることができる無血清培地は、通常組み換えタンパク質の産生に用いられている培地であればいかなるものでもよく、特に限定されるものではない。

ヒトIAPを有する細胞に結合する本発明の再構成ポリペプチドの製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明の再構成ポリペプチ

ドは哺乳類細胞、例えばCOS 7細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス（Human cytomegalovirus : HCMV）前期（immediate early）プロモーターを使用する
5 のが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HC γ 1, HCMV-VL-HCK等であって、PSV2neoに由来するプラスミドベクター（国際公開公報WO 92/19759参照）が包含される。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺
10 伝子発現のプロモーターとしてはレトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチドチェーン・エロンゲーション・ファクター1 α （HEF-1 α ）などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C. らの方法（Nature, 277, 108-
15 114, (1979)）、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法（Nucleic Acids Research, 18, 5322, (1990)）に従えば容易に実施することができる。

複製起原（ori）としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス（BPV）等の由来のoriを用いることができ、さ
20 らに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅などのため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホストトランスフェラーゼAPH（3'）II あるいはI（neo）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Eco g p t）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子等を含むことができる。

25 上述のように作成した再構成ポリペプチドの抗原結合活性は、ヒトIAPに対するマウスMABL-1、MABL-2抗体の結合阻害能を指標にして評価することができる。具体的には、マウスMABL-2抗体のヒトIAP抗原への濃度依存的阻害作用の有無を指標にして評価する。

具体的には、本発明の再構成ポリペプチドをコードするDNAを包含する発現ベクターで形質転換した動物細胞、例えばCOS7細胞又はCHO細胞を培養し、前記培養した細胞及び／又はその培養上清、又はこれらから精製した再構成ポリペプチドを用いて抗原への結合を測定する。対照として発現ベクターのみで形質
5 転換した細胞の培養上清などを用いる。ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現するマウス白血病細胞株L1210細胞に、本発明の再構成ポリペプチドなどの試験試料又は対照の培養上清を加え、例えばフローサイトメトリーを実施して抗原結合活性を評価する。

in vitro でのアポトーシス誘起効果は、ヒトIAPを遺伝子導入した細胞に、
10 前述の再構成ポリペプチドの試験試料を添加し、当該細胞においてヒトIAP抗原特異的に細胞死を誘導するか否かを評価する。

in vivo でのアポトーシス誘起効果の評価は、次の通りに行う。先ずヒト骨髓腫のモデルマウスを作成し、当該マウスにIAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体、本発明の再構成ポリペプチドを静脈投与
15 する。対照群にはPBSのみを投与する。そして、アポトーシス誘起を、抗腫瘍効果としてマウス血清中のヒトIgGの量の変化及び生存期間によって評価する。

赤血球の凝集作用は、健常人より採取した血液から赤血球浮遊液を調製し、これに種々の濃度の試験試料を添加してインキュベーションし、赤血球の凝集を判定することによって検査する。

20 本発明の再構成ポリペプチドは、2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含むものであり、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖Fvのダイマー、トリマーもしくはテトラマー、好ましくはダイマー、又は2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を連結したポリペプチドである。このような構成をとることで、もとのモノクローナル抗体の抗原結合部位の立体構造
25 を模倣して、優れた抗原結合性を保持するものと考えられる。

本発明の再構成ポリペプチドは、whole IgGに比べ組織、腫瘍への移行性に優れており、さらに赤血球の凝集という副作用が顕著に低減されたか又は生じないため、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血

病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髄腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫（Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫）、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、真性多血症などの血液疾患の治療薬としての利用が期待される。また、RI標識による造影剤としての利用も期待され、
5 RI化合物やトキシンと結合させることにより、効力を増強させることも可能である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の
10 範囲が限定されるものではない。

本発明の再構成ポリペプチドの製造方法を、下記の一本鎖Fvの作製を例にして説明する。本発明の再構成ポリペプチドの製造方法において用いる、ヒトIAPに対するマウスMABL-1、MABL-2抗体を産生するハイブリドーマ、MABL-1及びMABL-2は、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、1997
15 年9月11日に、受託番号それぞれFERM BP-6100、FERM BP-6101として国際寄託されている。

実施例1 （ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化）
20

ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体MABL-1及びMABL-2の可変領域をコードするDNAを次のようにしてクローン化した。

1. 1 メッセンジャーRNA (mRNA) の調製

ハイブリドーマMABL-1及びMABL-2からのmRNAを、mRNA
25 Purification Kit (Pharmacia Biotech社製) を用いて調製した。

1. 2 二本鎖cDNAの合成

約1 µgのmRNAより Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製) を用いて二本鎖cDNAを合成し、アダプターを連結した。

1. 3 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler (PERKIN ELMER 社製) を用いてPCR法を行った。

(1) MABL-1 L鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

PCR法に使用するプライマーは、アダプターの部分配列とハイブリダイズする配列番号：1に示すアダプタープライマー1 (CLONTECH 社製)、及びマウスカ
5 ャパ型L鎖C領域配列とハイブリダイズする配列番号：2に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

PCR溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2 mM MgCl₂、
0.16 mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、2.5ユ
10 ニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、0.2 μ Mの配列番号：1に示すアダプタープライマーと0.2 μ Mの配列番号：2に示すMKCプライマー及びMABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを含有し、
94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反
15 復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。

(2) MABL-1 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、及び配列番号：3に示すMHC- γ 1 (Mouse Heavy Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

20 cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 1プライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1. 3 (1) においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

(3) MABL-2 L鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
25 及び配列番号：2に示すMKCプライマーを用いた。

cDNAの増幅は、MABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gの代わりにMABL-2由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを用いて増幅した点を除いて、前記1. 3 (1) においてMABL-1 L鎖V領域遺伝子の増幅について記載した

のと同じ方法により行った。

(4) MABL-2H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
及び配列番号：4に示すMHC- γ 2aプライマー (Bio/Technology, 9, 88-89,
5 1991) を用いた。

cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 2aプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1.3(3)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

1.4 PCR生成物の精製

10 前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解した。

1.5 連結及び形質転換

15 上記のようにして調製したMABL-1由来マウスカップ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片約140ngをpGEM-T Easyベクター (Promega 社製) 50ngと、30mM Tris-HCl (pH7.8)、10mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP及び3ユニット T4 DNAリガーゼ (Promega 社製) を含有する反応混合液中で、15℃にて3時間反応させ連結した。

20 次に、1 μ lの上記連結混合液を大腸菌DH5 α のコンピテント細胞 (東洋紡社製) 50 μ lに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、4℃にて1分間そして再び氷上で2分間静置した。次いで100 μ lのSOC培地 (GIBCO BRL 社製) を加え、100 μ g/mlのアンピシリン (SIGMA 社製) を含有するLB (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 寒天培地上にこの大腸菌を塗布し、37℃にて終夜培養して大腸菌形質転換体を得た。

25 この形質転換体を、50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB培地3ml中で37℃にて終夜培養し、そしてこの培養物から QIAprep Spin Miniprep Kit

(QIAGEN 社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。

こうして得られた、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpGEM-M1Lと命名した。

- 5 上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M1Hと命名した。

- また、ハイブリドーマMABL-2に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M2Lと命名した。
- 10

また、ハイブリドーマMABL-2に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M2Hと命名した。

実施例2 (DNAの塩基配列の決定)

- 15 前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列の決定は、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem 社製) 及び ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem 社製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。

- プラスミドpGEM-M1Lに含まれるマウスMABL-1抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 5に示す。
- 20

また、プラスミドpGEM-M1Hに含まれるマウスMABL-1抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 6に示す。

また、プラスミドpGEM-M2Lに含まれるマウスMABL-2抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 7に示す。

- 25 また、プラスミドpGEM-M2Hに含まれるマウスMABL-2抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 8に示す。

実施例3 (CDRの決定)

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ

4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作製された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめ、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示す如く決定した。

表 1

| プラスミド | 配列番号 | CDR(1) | CDR(2) | CDR(3) |
|------------|------|--------|--------|---------|
| p GEM-M1 L | 5 | 43-58 | 74-80 | 113-121 |
| p GEM-M1 H | 6 | 50-54 | 69-85 | 118-125 |
| p GEM-M2 L | 7 | 43-58 | 74-80 | 113-121 |
| p GEM-M2 H | 8 | 50-54 | 69-85 | 118-125 |

実施例4 (クローン化cDNAの発現の確認(キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の作製))

4. 1 キメラMABL-1抗体発現ベクターの作製

キメラMABL-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスMABL-1 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpGEM-M1 L及びpGEM-M1 HをPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター(国際公開公報WO 92/19759参照)に導入した。

L鎖V領域のための前方プライマーMLS(配列番号: 9)及びH鎖V領域のための前方プライマーMHS(配列番号: 10)は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列(J. mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及びHind III 制限酵素部位を有する

ように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーMLAS（配列番号：11）及びH鎖V領域のための後方プライマーMHAS（配列番号：12）は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つスプライスドナー配列及びBamHI制限酵素部位を有するように設計した。

- 5 PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8ngの鋳型DNA（pGEM-M1L及びpGEM-M1H）を含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。

- PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社製）を用いて精製し、Hind III 及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF- κ に、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF- γ にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M1L、HEF-M1Hと命名した。

4. 2 キメラMABL-2抗体発現ベクターの作製

- cDNAの修飾及びクローニングは、pGEM-M1L及びpGEM-M1Hの代わりにpGEM-M2L及びpGEM-M2Hを鋳型DNAに増幅した点を除いて、前記4. 1において記載したのと同じ方法により増幅及びクローニングを行い、DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M2L、HEF-M2Hと命名した。

4. 3 COS7細胞への遺伝子導入

- 25 キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS7細胞において試験した。

(1) キメラMABL-1抗体の遺伝子導入

HEF-M1LとHEF-M1Hベクターを、Gene Pulser 装置（BioRad 社

製)を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞に同時形質転換した。各DNA(10 μ g)と、PBS中1 \times 10⁷細胞/mlの0.8mlをキュベットに加え、1.5kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、
5 10%の γ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液(GIBCO BRL 社製)に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

(2) キメラMABL-2抗体の遺伝子導入

キメラMABL-2抗体遺伝子の導入は、HEF-M1LとHEF-M1Hベクターの代わりにHEF-M2LとHEF-M2Hベクターを用いた点を除いて、
10 前記4.3(1)に記載したのと同じ方法によりCOS7細胞に同時形質転換し、回収培養上清を得た。

4.4 フローサイトメトリー

抗原への結合を測定するため、前記COS7細胞培養上清を用いてフローサイ
15 トメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞4 \times 10⁵個に、キメラMABL-1抗体を発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはキメラMABL-2抗体を発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてヒトIgG1抗体(SIGMA 社製)を加え、氷上にてインキュベ
ーション及び洗浄の後、FITC標識した抗ヒトIgG抗体(Cappel 社製)を加
20 えた。インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置(BECTON DICKINSON 社製)にて蛍光強度を測定した。

その結果、キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体は、ヒトIAPを発現するL1210細胞に特異的に結合したことにより、これらのキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体MABL-1及びMABL-2のそれぞれのV領
25 域の正しい構造を有することが明らかとなった(図1~3)。

実施例5 (再構成MABL-1抗体及び再構成MABL-2抗体一本鎖Fv(scFv)領域の作製)

5.1 再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの作製

再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vを次の様にして作製した。再構成MAB L-1 抗体H鎖V領域、リンカー領域、及び再構成MAB L-1 抗体L鎖V領域をそれぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより、再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vを作製した。この方法を図4に模式的に示す。再構成MAB L-1 抗体一本鎖F_vの作製のために6個のPCRプライマー（A～F）を使用した。プライマーA、C及びEはセンス配列を有し、プライマーB、D及びFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマーVHS（プライマーA、配列番号：13）は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つNcoI制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーVHAS（プライマーB、配列番号：14）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーとオーバーラップするように設計した。

リンカーのための前方プライマーLS（プライマーC、配列番号：15）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーLAS（プライマーD、配列番号：16）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。

L鎖V領域のための前方プライマーVLS（プライマーE、配列番号：17）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーVLAS-FLAG（プライマーF、配列番号：18）は、L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P. ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びEcoRI制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブルさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、

再構成MABL-1抗体一本鎖F_vをコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成MABL-1抗体H鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1H（実施例2を参照）、Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser（配列番号：19）からなるリンカー領域をコードするDNA配列（Huston, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドpSC-DP1、及び再構成MABL-1抗体L鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1L（実施例2を参照）をそれぞれ鋳型として用いた。

- 10 第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、2.5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上 PERKIN ELMER 社製）、0.4 μ Mずつの各プライマー及び5 ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。
- 15 この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

- PCR生成物A-B（371bp）、C-D（63bp）、及びE-F（384bp）をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社製）を用いて精製し、第二PCRでアッセンブルした。第二PCRにおいて、鋳型として120ngの第一PCR生成物A-B、20ngのPCR生成物C-D及び120ngのPCR生成物E-F、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上 PERKIN ELMER 社製）を含有する98 μ lのPCR混合液を、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて8分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、65 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間、
- 25 この順序で加熱した。この温度サイクルを2回反復した後、それぞれ0.4 μ MのプライマーA及びFを加えた。そして94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて1分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱し、この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を72 $^{\circ}$ Cにて7分間加

熱した。

第二PCRにより生じた843bpのDNA断片を精製し、NcoI及びEcoRIで消化し、得られたDNA断片をpSCFVT7ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクターpSCFVT7は、大腸菌ペリプラズム分泌発現系に適するpelBシグナル配列 (Lei, S. P. ら、J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987) を含んでいる。DNA配列決定の後、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpscM1と命名した (図5を参照)。本プラスミドpscM1に含まれる再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 20に示す。

次に、哺乳動物細胞にて再構成MABL-1抗体一本鎖Fvを発現するベクターを作製するため、pscM1ベクターをPCR法により修飾した。そして得られたDNA断片をpCHO1発現ベクターに導入した。なお、本発現ベクターpCHO1は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (WO92/19759参照) から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つSalI制限酵素認識部位を有する配列番号: 21に示すSal-VHSプライマー及び後方プライマーとして第一フレームワーク配列の最後をコードするDNAにハイブリダイズする配列番号: 22に示すFRH1antiprimerを用いた。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8ngの鋳型DNA (pscM1) を含有し、95 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に95 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製

し、S a l I 及びM b o II で消化し、N末端側再構成M A B L-1 抗体一本鎖F v をコードするDNA断片を得た。また、p s c M1 ベクターをM b o II 及びE c o R I で消化し、C末端側再構成M A B L-1 抗体一本鎖F v をコードするDNA断片を得た。そして、S a l I-M b o II DNA断片及びM b o II-E c o R I DNA断片をp C H O1-I g s ベクターにクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをp C H O M1 と命名した（図6を参照）。なお、本発現ベクターp C H O1-I g s は、哺乳動物細胞分泌発現系に適するマウスI g G1 シグナル配列（Nature, 332, 323-327, 1988）を含んでいる。本プラスミドp C H O M1 に含まれる再構成M A B L-1 抗体一本鎖F v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：23に示す。

5. 2 再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の作製

再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v を前記5. 1 に従って作製した。第一P C Rにおいては、p G E M-M1 Hの代わりに再構成M A B L-2 抗体H鎖V領域をコードするプラスミドp G E M-M2 H（実施例2を参照）、及びp G E M-M1 Lの代わりに再構成M A B L-2 抗体L鎖V領域をコードするプラスミドp G E M-M2 L（実施例2を参照）を使用し、再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドp s c M2を得た。本プラスミドp s c M2に含まれる再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：24に示す。

また、p s c M2 ベクターの修飾により再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含む哺乳動物細胞発現用p C H O M2 ベクターを得た。本プラスミドp C H O M2 に含まれる再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：25に示す。

5. 3 C O S 7 細胞への遺伝子導入

再構成M A B L-2 抗体一本鎖F v の一過性発現を観察するため、p C H O M2 ベクターをC O S 7 細胞において試験した。

p C H O M2 ベクターを、Gene Pulser 装置（BioRad 社製）を用いてエレクト

ロポレーションによりCOS 7細胞に形質転換した。DNA (10 μ g) と、PBS中 1×10^7 細胞/mlの0.8 mlをキュベットに加え、1.5 kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。

- 5 室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するIMDM培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5. 4 COS 7細胞培養上清中の再構成MABL-2抗体一本鎖Fvの検出

- 10 pCHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS 7細胞培養上清中における再構成MABL-2抗体一本鎖Fvをウェスタンブロッティング法により確認した。

- pCHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS 7細胞培養上清及びコントロールとしてpCHO1ベクターを遺伝子導入したCOS 7細胞培養上清についてSDS電気泳動を行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、15 0.05% Tween 20-PBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG抗体 (Zymed 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液 (Kirkegaard Perry Laboratories 社製) を添加し、発色させた (図7)。

- 20 その結果、pCHOM2ベクター導入COS 7細胞培養上清中にのみFLAGペプチド特異的なタンパク質が検出され、この培養上清中に再構成MABL-2抗体一本鎖Fvが分泌されていることが明らかとなった。

5. 5 フローサイトメトリー

- 25 抗原への結合を測定するため、前記COS 7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現するマウス白血病細胞株L1210細胞、あるいはコントロールとしてpCOS1ベクターを形質転換したL1210細胞 2×10^5 個に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvを発現させたCOS 7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてpC

HO1ベクターを形質転換したCOS7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、マウス抗FLAG抗体（SIGMA社製）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識した抗マウスIgG抗体（BECTON DICKINSON社製）を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACS ca n装置（BECTON DICKINSON社製）にて蛍光強度を測定した。

その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvは、ヒトIAPを発現するL1210細胞に特異的に結合したことにより、この再構成MABL-2抗体一本鎖Fvがヒト Integrin Associated Protein に対するアフィニティーを有することが明らかとなった（図8～11）。

10 5. 6 Competitive ELISA

マウスモノクローナル抗体の抗原結合に対する阻害活性を指標に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvの抗原結合活性を測定した。

1 μ g/mlに調整した抗FLAG抗体を96ウェルプレートの各ウェルに加え、37℃にて2時間インキュベートした。洗浄後、1%BSA-PBSにてブロッキングを行った。室温にてインキュベート及び洗浄後、分泌型ヒトIAP抗原遺伝子（配列番号：26）を導入したCOS7細胞培養上清をPBSにて2倍希釈したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、100 ng/mlに調整したビオチン化MABL-2抗体50 μ l及び順次希釈した再構成MABL-2抗体一本鎖Fv発現COS7細胞培養上清50 μ lを混和したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン（Zymed社製）を加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、基質溶液（SIGMA社製）を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。

その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fv（MABL2-scFv）は、コントロールのpCHO1導入COS7細胞培養上清に比較して明らかに濃度依存的にマウスMABL-2抗体のヒトIAP抗原への結合を阻害した（図12）。このことから、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvは、マウスモノクローナル抗体MABL-2のそれぞれのV領域の正しい構造を有することが示唆された。

5. 7 in vitro でのアポトーシス誘起効果

ヒト I A P を遺伝子導入した L 1 2 1 0 細胞、及びコントロールとして p C O S 1 ベクターを遺伝子導入した L 1 2 1 0 細胞、及び C C R F - C E M 細胞を用い、再構成 M A B L - 2 抗体一本鎖 F v のアポトーシス誘起作用を A n n e x i n - V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

各細胞 1×10^5 個に、再構成 M A B L - 2 抗体一本鎖 F v 発現 C O S 7 細胞培養上清あるいはコントロールとして p C H O 1 ベクター導入 C O S 7 細胞培養上清を終濃度 50 % で添加し、24 時間培養した。その後、A n n e x i n - V 染色を行い、F A C S c a n 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

A n n e x i n - V 染色による解析の結果を図 13 ~ 18 にそれぞれ示した。ここで、図の左下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス初期の細胞を、右上の領域はアポトーシス後期の細胞を示す。その結果、再構成 M A B L - 2 抗体一本鎖 F v (M A B L 2 - s c F v) は L 1 2 1 0 細胞においてヒト I A P 抗原特異的に著しい細胞死を誘導した (図 13 ~ 16)。また、C C R F - C E M 細胞においてもコントロールに比較して著しい細胞死を誘導した (図 17 ~ 18)。

5. 8 CHO 細胞における M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v ポリペプチドの発現

M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v (ポリペプチド) の恒常的発現 CHO 細胞株を樹立するため、p C H O M 2 ベクターを CHO 細胞に遺伝子導入した。

p C H O M 2 ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションにより CHO 細胞に形質転換した。DNA ($10 \mu\text{g}$) と P B S に懸濁した CHO 細胞 (1×10^7 細胞 / ml) の 0.7 ml を混合したものをキューベットに加え、1.5 kV、25 μF の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10 % のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM 培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。得られたクローンについて、S D S - P A G E にて目的とするタンパク質の発現

を確認し、発現量の高いクローンをMABL-2抗体由来の一本鎖F_vの産生細胞株として選択した。10 nM methotrexate (SIGMA 社製)を含む無血清培地 CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製)にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5 5. 9 CHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖F_vの精製

5. 8で得た一本鎖F_v発現CHO産生株の培養上清を人工透析用カートリッジ (PAN130SF、旭メディカル) を用いて約20倍まで濃縮した。濃縮液は-20℃で保存し、精製時解凍して用いた。

CHO細胞培養上清から一本鎖F_vの精製は、Blue-sepharose、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三種のクロマトグラフィーにより行った。

(1) Blue-sepharose カラムクロマトグラフィー

培養上清の濃縮液を20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にて10倍希釈し、遠心分離 (10000 rpm×30分) により不溶物を除去した。上清を同緩衝液で平衡化した Blue-sepharose カラム (20 ml) に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中NaCl濃度を0.1、0.2、0.3、0.5及び1.0Mまで段階的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。SDS-PAGEで素通り及び各溶出画分を分析し、一本鎖F_vが確認された画分 (0.1~0.3M NaCl溶出画分) をプールし、Centriprep-10 (アミコン) を用いて約20倍濃縮した。

20 (2) ハイドロキシアパタイト

(1) の濃縮液を10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて10倍希釈し、ハイドロキシアパタイトカラム (20 ml、BioRad) に添加した。60 ml の10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を200 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した (図19)。SDS-PAGEにより各画分を分析した結果、画分A及び画分Bに一本鎖F_vが確認された。

(3) ゲル濾過

(2) の画分A及びBをそれぞれ Centriprep-10 を用いて濃縮し、0.15M

NaClを含む20mM 酢酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したTSKGelG
3000SWGカラム (21.5×600mm) に添加した。クロマトグラムを図
20に示す。得られた画分をSDS-PAGEで分析した結果、いずれも主要ピーク (A I、B I) が目的の一本鎖F_vであり、ゲル濾過で分析した結果、画分
5 Aでは見かけ上の分子量約36kD、画分Bでは同76kDに溶出された。精製
した一本鎖F_v (A I、B I) を15%-SDS-ポリアクリルアミドゲルを用
いて分析した。サンプルを還元剤添加、非添加で処理し、Laemmliの方法
に準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。
図21に示すように、A I、B Iいずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見か
10 け上の分子量約35kDに単一バンドを与えた。以上の結果から、A Iは一本鎖
F_vのモノマーで、B Iは一本鎖F_vの非共有結合性ダイマーと考えられる。画
分A I及びB IをTSKGelG3000SWカラム (7.5×60mm) を用
いたゲル濾過により分析した結果、画分A Iはモノマーのピークのみ、画分B I
はダイマーのピークのみ検出された (図22を参照)。また、ダイマー画分 (画分
15 B I) は、全一本鎖F_vの約4%であった。該ダイマー画分中のダイマーは、そ
の90%以上が4℃で1ヶ月以上安定的に維持された。

5. 10 大腸菌細胞でのMABL-2抗体由来の一本鎖F_vポリペプチド発現ベクターの構築

MABL-2抗体由来の一本鎖F_vを大腸菌菌体内にて効率的に発現するベク
20 ターを作製するため、pSCM2ベクターをPCR法により修飾した。得られた
DNA断片をpSCFVT7発現ベクターに導入した。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端を
コードするDNAにハイブリダイズし且つ開始コドン及びNdeI制限酵素認識
部位を有する配列番号：27に示すNde-VHSm02プライマー及び後方プ
25 ライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つ
2個の停止コドン及びEcoRI制限酵素認識部位を有する配列番号：28に示
すVLASプライマーを用いた。なお、前方プライマーのNde-VHSm02
は大腸菌菌体内にて効率的に発現するため、H鎖V領域のN末端をコードするD

NAにハイブリダイズする部分に5カ所の点変異を含んでいる。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10×PCR Buffer #1、1mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（以上東洋紡社製）、1 μ Mずつの各プライマー、及び100 ngの鋳型DNA（p s c M2）を含有し、98℃にて15秒間、65℃にて2秒間及び74℃にて30秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、Nde I 及び Eco R I で消化し、得られたDNA断片を p S C F V T 7 ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクター p S C F V T 7 は Nde I 及び Eco R I で消化したことにより p e l B シグナル配列が削除されている。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドを p s c M2 D E m 0 2 と命名した（図23を参照のこと）。本プラスミド p s c M2 D E m 0 2 に含まれる M A B L - 2 抗体由来の一本鎖 F v の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：29に示す。

5. 1 1 大腸菌細胞におけるMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの発現

MABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドを発現する大腸菌株を得るため、p s c M2 D E m 0 2 ベクターを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S (STRATAGENE 社製) に形質転換した。得られたクローンについて、SDS-PAGEにて目的とするタンパク質の発現を検討し、発現量の高いクローンをMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの産生株として選択した。

5. 1 2 大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの精製

形質転換して得られた大腸菌のシングルコロニーをLB培地3mlにて28℃で7時間培養し、これを70mlのLB培地に植え継ぎ、28℃にて一夜培養を行った。この p r e - c u l t u r e を7LのLB培地に植え継ぎ、ジャーファーマンターを用いて28℃、攪拌速度300rpmにて培養した。O.D.=1.5のときに1mM IPTGで誘導をかけ、その後3時間培養を行った。

培養液を遠心分離（ $10000\times g$ 、10分）し、沈殿として回収した菌体に5mM EDTA、0.1M NaCl、1% Triton X-100を含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）を加え、超音波（out put: 4、duty cycle: 70%、1分 \times 10回）により菌体を破碎した。この懸濁液を遠心分離（ $2000\times g$ 、10分）にかけ、沈殿として回収した封入体に5mM EDTA、0.1M NaCl、4% Triton X-100を含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）を加え、再度超音波処理（out put: 4、duty cycle: 50%、30秒 \times 2）を行い、遠心分離（ $12000\times g$ 、10分）により目的蛋白質を沈殿として回収し、上清にくる夾雑蛋白質を除去した。

- 10 目的蛋白質を含んだ封入体を6M Urea、5mM EDTA、0.1M NaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）に溶解し、4M Urea、5mM EDTA、0.1M NaCl、10mM メルカプトエタノールを含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したSephacryl S-300（ 5×90 cm、アマシャム・ファルマシア社製）ゲル濾過カラムに、
15 流速5ml/分で添加し、会合している高分子量の一本鎖Fvを除去した。各画分をSDS-PAGEで分析し、純度の高い画分について、 $O.D_{280}=0.25$ になるようにゲル濾過で用いた溶媒で希釈後、5mM EDTA、0.1M NaCl、0.5M Arg、2mM 還元型グルタチオン、0.2mM 酸化型グルタチオンを含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）に対して透析を3回行う
20 ことにより、巻き戻し操作を行った。さらに0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液（pH6.0）に対して3回透析し、溶媒交換を行った。

- わずかに含まれる分子間でS-S結合で架橋された高分子を分離除去するため、0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液（pH6.0）で平衡化したSuperdex 200pg（ 2.6×60 cm、アマシャム・ファルマシア社製）ゲル濾過カラムに添加した。図24に示すように、高分子量の会合体と考えられるブロードなピークのあと、主要ピークとサブピークの2つのピークが検出された。SDS-PAGEによる分析（図21参照）及びゲル濾過の溶出位置から、主要ピークは一本鎖Fvポリペプチドのモノマーであり、サブピークは非共有結合性
- 25

のダイマーと考えられる。なお、形成された非共有結合性のダイマーは、全一本鎖Fvポリペプチドの約4%であった。

5. 13 MABL-2抗体由来の精製一本鎖Fvポリペプチドの in vitro でのアポトーシス誘起効果

5 ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(hIAP/L1210)を用い、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチド(MABL2-scFv)のアポトーシス誘起作用を、次の2つのプロトコールにてAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

10 第一のプロトコールは、hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、24時間培養した。抗体試料として、5. 9で得たCHO細胞由来MABL2一本鎖Fvのモノマー及びダイマー、さらに5. 12で得た大腸菌細胞由来の同モノマー及びダイマー、そしてコントロールとしてマウスIgG抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を行い、FACScan装置(BECTON DICKINSON 社製)にて蛍光強度を測定した。

15 また、第二のプロトコールは、hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、2時間培養後に抗FLAG抗体(SIGMA 社製)を終濃度 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、更に22時間培養した。抗体試料として、5. 9で得たCHO細胞由来MABL2一本鎖Fvのモノマー及びコントロールとしてマウスIgG抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を
20 行い、FACScan装置にて蛍光強度を測定した。

Annexin-V染色による解析の結果を図25～31にそれぞれ示した。その結果、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来一本鎖Fvポリペプチドのダイマーはコントロール(図25)と比較して著しい細胞死を誘導した(図26、27)が、CHO細胞及び大腸菌細胞産生の一本鎖Fvポリペプチドのモノマーのアポトーシス誘導作用は認められなかった(図28、29)。また、抗FLAG抗体の添加により、CHO細胞産生のMABL-2抗体由来一本鎖Fvポリペプチドのモノマーはコントロール(図30)と比較して著しい細胞死を誘導した(図31)。

5. 14 s c F v / C H Oポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫
マウスモデルに対する抗腫瘍効果

(1) マウス血清ヒト I g G 定量法

マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生するヒト I g G (Mタンパク
5 質)の定量は、以下のE L I S Aで行った。0.1%重炭酸緩衝液(p H 9.6)
で1 μ g / m l に希釈したヤギ抗ヒト I g G 抗体(BIOSOURCE 社製、L o t # 7
9 0 2) 1 0 0 μ l を96ウェルプレート(Nunc 社製)に加え、4℃で一晩イン
キュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階希釈したマウス
血清あるいは標品としてヒト I g G (Cappel 社製、L o t # 0 0 9 1 5) 1 0 0
10 μ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、5 0 0 0 倍希
釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト I g G 抗体(BIOSOURCE 社製、L o
t # 6 2 0 2) 1 0 0 μ l を加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗
浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model
3550 (BioRad 社製)を用いて4 0 5 n mの吸光度を測定し、標品のヒト I g G の
15 吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒト I g G (Mタンパク質)濃
度を算出した。

(2) 投与抗体の調製

s c F v / C H Oポリペプチドのモノマー及びダイマーは、投与当日、濾過滅
菌したP B S (一)を用いて、それぞれ0.4 m g / m l、0.25 m g / m l に
20 なるように調製し、投与試料とした。

(3) ヒト骨髓腫マウスモデルの作製

ヒト骨髓腫マウスモデルは以下のように作製した。S C I Dマウス(日本クレ
ア)を用いて in vivo 継代したK P M M 2細胞(特開平7-236475号公
報)を10%ウシ胎児血清(GIBCO BRL 社製)を含むR P M I 1 6 4 0 培地
25 (GIBCO BRL 社製)で3 \times 1 0 ⁷ 個 / m l になるように調製した。あらかじめ前日
抗アシアロGM1抗体(和光純薬社製、1バイアルを5 m l で溶解) 1 0 0 μ l
を皮下投与したS C I Dマウス(オス、6週齢)(日本クレア)に上記K P M M 2
細胞懸濁液2 0 0 μ l (6 \times 1 0 ⁶ 個 / マウス)を尾静脈より注入した。

(4) 抗体投与

(3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルに対し、K PMM 2 細胞移植後 3 日目より、1 日 2 回、3 日間、上記 (2) で調製した投与試料、モノマーは 250 μ l、ダイマーは 400 μ l を、尾静脈より投与した。対照として、濾過滅菌した PBS (一) を同様に 1 日 2 回、3 日間、200 μ l、尾静脈より投与した。両群とも、1 群 7 匹で行った。

(5) s c F v / CHO ポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果の評価

s c F v / CHO ポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫マウスモデルの抗腫瘍効果については、当該骨髓腫細胞が産生するヒト I g G (Mタンパク質) のマウス血清中の量の変化、及び生存期間で評価した。マウス血清中のヒト I g G 量の変化については、K PMM 2 細胞移植後 24 日目に血清を採取し、上記 (1) で述べた E L I S A を用いてヒト I g G 量を測定した。その結果、PBS (一) 投与群では、血清ヒト I g G (Mタンパク質) 量が約 8500 μ g / ml まで上昇しているのに対し、s c F v / CHO ダイマー投与群では対照群の 1 / 10 以下と顕著に低値であり、s c F v / CHO ダイマーが K PMM 2 細胞の増殖を非常に強く抑制していることが示された (図 3 2)。一方、生存期間についても図 3 3 に示すとおり、s c F v / CHO ダイマー投与群では PBS (一) 投与群と比較して顕著な生存期間の延長が認められた。

以上より、s c F v / CHO ダイマーがヒト骨髓腫マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。本発明の再構成ポリペプチドである s c F v / CHO ダイマーの抗腫瘍効果は、当該再構成ポリペプチドが有するアポトーシス誘起作用に基づくと考えられる。

5. 1 5 赤血球凝集試験

赤血球凝集試験及び赤血球凝集の判定法は、続生化学実験講座の免疫生化学研究法 (日本生化学会編、東京化学同人) に準じて実施した。

健康人の血液をヘパリン処理した注射筒により採血し、PBS (一) により 3 回洗浄した後、PBS (一) にて最終濃度が 2 % の赤血球浮遊液を作製した。検

査サンプルは、対照としてマウス I g G (Zymed 社製) を用い、MABL-2 抗
 体、CHO 細胞産生の一本鎖 F v ポリペプチドモノマー、ダイマー、大腸菌産生
 の一本鎖 F v ポリペプチドのモノマーとダイマーを使用した。赤血球の凝集作用
 を検討するために、ファルコン社製の U 底の 96 ウェルプレートを使用し、上記
 5 の抗体サンプルを 50 μ l / ウェル添加した中に、2% 赤血球浮遊液をさらに 5
 0 μ l 添加、混和し、37℃で2時間インキュベーション後、4℃で一昼夜保存
 し、凝集を判定した。また、対照として、PBS (-) を 50 μ l / ウェル添加
 し、抗体サンプルと同様にして凝集試験を行った。抗体の最終濃度は、マウス I
 g G、MABL-2 抗体は、0.01、0.1、1、10、100 μ g / ml、一
 10 本鎖 F v は、0.004、0.04、0.4、4、40、80 μ g / ml で大腸菌産
 生の一本鎖 F v ポリペプチドのダイマーのみさらに 160 μ g / ml の用量を設
 定した。その結果は、下記の表 2 に示す通り、MABL-2 抗体では、0.1 μ g
 / ml 以上で赤血球凝集が見られたのに対し、一本鎖 F v ポリペプチドではモノ
 マー、ダイマー共に赤血球凝集は認められなかった。

15

表 2

赤血球凝集試験

| | 対照 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | (μg/mL) | |
|-------------------|----|-------|------|-----|-----|-----|---------|-------------|
| mIgG | - | - | - | - | - | - | | |
| MABL-2(intact) | - | - | + | +++ | +++ | ++ | | |
| | 対照 | 0.004 | 0.04 | 0.4 | 4 | 40 | 80 | (μg/mL) |
| scFv/CHO モノマー | - | - | - | - | - | - | - | |
| scFv/CHO ダイマー | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 対照 | 0.004 | 0.04 | 0.4 | 4 | 40 | 80 | 160 (μg/mL) |
| scFv/E. coli モノマー | - | - | - | - | - | - | - | |
| scFv/E. coli ダイマー | - | - | - | - | - | - | - | |

実施例6 2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む再構成ポリペプチド $s c(F v)_2$ 及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 $s c F v$

6. 1 MABL-2抗体 $s c(F v)_2$ 発現プラスミドの構築

MABL-2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む再構成
5 ポリペプチド [$s c(F v)_2$] を発現するプラスミドを作製するため、前述 pCHOM2 (MABL-2抗体由来の $s c F v$ をコードするDNAを含む) を以下に示す通りPCR法により修飾し、得られたDNA断片をpCHOM2に導入した。

PCRに使用するプライマーは、センスプライマーとしてEF1 α をコードするDNAにハイブリダイズするEF1プライマー (配列番号: 30) を使用し、
10 アンチセンスプライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカー領域をコードするDNA配列 (配列番号: 19) 及びS a l I 制限酵素認識部位を有するVLLASプライマー (配列番号: 31) を使用した。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer #1、1mM M
15 g C l₂、0.2mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (以上東洋紡社製)、1 μ Mの各プライマー、及び100ngの鋳型DNA (pCHOM2) を含有する。PCR溶液を94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、50 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び74 $^{\circ}$ Cにて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した。

20 PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、S a l I で消化し、得られたDNA断片をpBluescript KS⁺ベクター (東洋紡社製) にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをS a l I で消化し、得られたDNA断片をS a l I で消化したpCHOM2に Rapid DNA Ligation Kit (BOEHRINGER
25 MANNHEIM 社製) を用いて連結した。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpCHOM2(Fv)₂と命名した (図34を参照)。本プラスミドpCHOM2(Fv)₂に含まれるMABL-2抗体 $s c(F v)_2$ 領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 32に示す。

6. 2 種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体s c F v発現 プラスミドの作製

種々の長さのペプチドリンカーを有し、そして[H鎖] - [L鎖] (以下HL)、
[L鎖] - [H鎖] (以下LH) となるようにV領域を連結したs c F vを、MA
5 B L-2由来のH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として以下の通りに作製した。

HLタイプのs c F vを作製するために、まずpCHOM2(Fv)₂を鋳型とし
てCFHL-F1 (配列番号: 33) 及びCFHL-R2 (配列番号: 34) プ
ライマー、CFHL-F2 (配列番号: 35) 及びCFHL-R1プライマー
(配列番号: 036) によりKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30
10 秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配
列を含むH鎖、及び3'側にFLAG配列を含むL鎖のcDNA遺伝子を作製した。
得られたH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて9
4℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行
い、CFHL-F1及びCFHL-R1プライマーを加えてさらに30サイクル
15 反応することによりリンカーを含まないHL-0タイプのcDNAを作製した。

LHタイプのs c F vを作製するために、まずMABL-2のL鎖及びH鎖V
領域のcDNAを含むプラスミドpGEM-M2L及びpGEM-M2H (特願
平11-63557参照) を鋳型として、それぞれT7 (配列番号: 37) 及び
CFLH-R2 (配列番号: 38) プライマー、CFLH-F2 (配列番号: 3
20 9) 及びCFLH-R1 (配列番号: 40) プライマーを用いてKODポリメラ
ーゼ (東洋紡) にて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回
繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むL鎖、及び3'側にFL
AG配列を含むH鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたL鎖及びH鎖cDN
Aを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、
25 72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、T7及びCFLH-R1
プライマーを加えてさらに30サイクル反応した。この反応産物を鋳型とし、C
FLH-F4 (配列番号: 41) 及びCFLH-R1プライマーを用いて94℃
30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行う

ことによりリンカーを含まないLH-0タイプのcDNAを作製した。

こうして作製したLH-0、HL-0タイプのcDNAを制限酵素EcoRI、
BamHI（宝酒造）処理し、XhoI制限酵素切断部位を含まない哺乳動物発
現プラスミドINPEP4にLigation High（東洋紡）を用いて導入し、
5 Competent E. coli JM109（ニッポンジーン）を形質転換した。形質転換し
た大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit（QIAGEN）にてプラスミドを精製した。
こうしてプラスミドpCF2LH-0及びpCF2HL-0を作製した。

次に、リンカーサイズの異なる発現プラスミドを作製するためにHLタイプで
はpCF2HL-0を鋳型としてCFHL-X3（配列番号：42）、CFHL-
10 X4（配列番号：43）、CFHL-X5（配列番号：44）、CFHL-X6
（配列番号：45）、又はCFHL-X7（配列番号：46）のセンスプライマー
及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的なBGH-1（配列番
号：47）プライマーを用いてKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃3
0秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、得られた反応産
15 物を制限酵素XhoI、BamHI（宝酒造）にて処理した。得られた断片をp
CF2HL-0のXhoI、BamHIサイトにLigation High（東洋紡）を用
いて導入し、Competent E. coli JM109を形質転換した。形質転換した大腸
菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プ
ラスミドpCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2H
20 L-6及びpCF2HL-7を作製した。更にCOS7細胞での一過的発現に用
いる発現プラスミドを作製するために、pCF2HL-0、pCF2HL-3、
pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6及びpCF2HL-7
を制限酵素EcoRI及びBamHI（宝酒造）にて処理し、約800bpの断
片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断
25 片を哺乳動物細胞発現プラスミドpCOS1のEcoRI及びBamHIサイト
にLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α（東洋紡）を形
質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミド
を精製した。こうして、発現プラスミドCF2HL-0/pCOS1、CF2H

L-3/pCOS1、CF2HL-4/pCOS1、CF2HL-5/pCOS1、CF2HL-6/pCOS1及びCF2HL-7/pCOS1を作製した。
 代表的な例として、プラスミドCF2HL-0/pCOS1の構造を図35に示し、これに含まれるMABL2-scfv<HL-0>の塩基配列及びアミノ酸
 5 配列を配列番号：48に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図36に示す。

また、リンカーサイズの異なるLHタイプの発現プラスミドを作製するため、
 pCF2LH-0を鋳型としてCFLH-X3（配列番号：49）、CFLH-X4（配列番号：50）、CFLH-X5（配列番号：51）、CFLH-X6（配
 10 列番号：52）又はCFLH-X7（配列番号：53）のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的なBGH-1プライマーを用いてKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、得られた反応産物を制限酵素XhoI、
 BamHIにて処理した。得られた断片をpCF2LH-0のXhoI、Bam
 15 HIサイトにLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α（東洋紡）を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kitにてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドpCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6及びpCF2LH-7を作製した。更にCOS7細胞での一過的発現に用いる発現プラスミドを作製するために、
 20 pCF2LH-0、pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6及びpCF2LH-7を制限酵素EcoRI及びBamHI（宝酒造）にて処理し、約800bpの断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミドpCOS1のEcoRI及びBamHIサイトにLigation Highを用いて導入し、
 25 Competent E. coli DH5α（東洋紡）を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kitにてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドCF2LH-0/pCOS1、CF2LH-3/pCOS1、CF2LH-4/pCOS1、CF2LH-5/pCOS1、CF2LH-6/pCOS1及

びCF2LH-7/pCOS1を作製した。代表的な例として、プラスミドCF2LH-0/pCOS1の構造を図37に示し、これに含まれるMABL2-s cFv<LH-0>の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：54に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図38に示す。

5 6. 3 COS7細胞におけるs cFv及びs c(Fv)₂の発現

(1) 有血清培地での培養上清の調製

HLタイプ、LHタイプs cFv及びs c(Fv)₂の発現のために、COS7細胞(JCRB9127、ヒューマンサイエンス振興財団)での一過的発現を行った。COS7細胞は10%牛胎児血清(Hyclone)を含むDMEM培地
10 (GIBCO BRL社製)にて、37℃の炭酸ガス恒温槽中で経代培養した。

6.2で構築したCF2HL-0, 3~7/pCOS1、もしくはCF2LH-0, 3~7/pCOS1又はpCHOM2(Fv)₂ベクターを、Gene Pulser 装置(BioRad社製)を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞にトランスフェクションした。

15 DNA(10μg)とDMEM(10%FBS, 5mM BES(SIGMA社))培地中2×10⁷細胞/mLの0.25mLをキュベットに加え、10分間静置の後に0.17kV、950μFの容量にてパルスを与えた。10分間静置の後、エレクトロポレーションされた細胞をDMEM(10%FBS)培地に混合し、75cm²フラスコに加えた。72時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により
20 細胞破片を除去し、更に0.22μmボルトトップフィルター(FALCON)にて濾過し、これを培養上清(CM)とした。

(2) 無血清培地での培養上清の調製

上記(1)と同様の方法でトランスフェクションした細胞をDMEM(10%FBS)培地に加え75cm³フラスコにて一夜培養した後、培養上清を捨て、PBSにて洗浄後、CHO-S-SFM II培地(GIBCO BRL社製)を添加した。7
25 2時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.22μmボルトトップフィルターにて濾過し、CMを得た。

6. 4 COS7 CM中のs cFv及びs c(Fv)₂の検出

前記6. 3 (2) で調製したCOS 7のCM中における種々のMABL 2-s c F v及びs c (F v)₂のポリペプチドを下記の通りにウェスタンブロッティング法により検出した。

各COS 7 CMについてについてSDS-PAGEを行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッティングを行い、TBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (Jackson Immuno Research 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液を添加し、発色させた (図39)。

10 6. 5 フローサイトメトリー

MABL 2-s c F v及びs c (F v)₂のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、前記6. 3 (1) にて調製したCOS 7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 2×10^5 個に、実施例6. 3 (1) で得られた培養上清あるいは対照としてCOS 7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のマウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、各COS 7培養上清中の種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL 2-s c F v及びs c (F v)₂は、ヒトIAPに対して高い親和性を有することが示された (図40a及びb)。

6. 6 in vitro でのアポトーシス誘起効果

前記1. 3 (1) にて調製したCOS 7細胞培養上清について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞 (hIAP/L1210) に対するアポトーシス誘導作用をAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、各ベクターを形質転換したCOS 7

細胞培養上清あるいはコントロールとしてCOS 7細胞培養上清を終濃度10%
で添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V/PI染色を行い、
FACSscan装置(BECTON DICKINSON 社製)にて蛍光強度を測定した。その結
果、COS 7 CM中のscFv<HL 3, 4, 6, 7>、LH 3, 4, 6, 7>
5 及びsc(Fv)₂はhIAP/L1210細胞に対して顕著な細胞死を誘導した。
得られた結果を図41にそれぞれ示す。

6. 7 MABL 2-scFv及びsc(Fv)₂のCHO細胞用発現ベクターの構築

前記MABL 2-scFv及びsc(Fv)₂を培養上清から精製することを目的
10 として、これらをCHO細胞にて発現させるための発現ベクターを以下のように
構築した。

前記1. 2にて調製したpCF2HL-0, 3~7及びpCF2LH-0, 3
~7のEcoRI-BamHI断片を、CHO細胞用発現ベクターpCHO1の
EcoRI及びBamHI部位にLigation Highを用いて導入し、Competent E.
15 coli DH5αを形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Midi
Kit (QIAGEN)にてプラスミドを精製した。このようにして発現プラスミドpCH
OM2HL-0, 3~7及びpCHOM2LH-0, 3~7を作製した。

6. 8 MABL 2-scFv<HL-0, 3~7>、MABL 2-scFv< LH-0, 3~7>及びsc(Fv)₂発現CHO細胞の作製並びにその培養上清の 20 調製

前記1. 7にて構築した発現プラスミドpCHOM2HL-0, 3~7及びp
CHOM2LH-0, 3~7並びにpCHOM2(Fv)₂ベクターを以下の通りに
CHO細胞に形質転換し、各再構成ポリペプチドを恒常的に発現するCHO細胞
を作製した。その代表的な例としてMABL 2-scFv<HL-5>、sc(F
25 v)₂を恒常的に発現するCHO細胞の作製を下記に示す。

発現プラスミドpCHOM2HL-5及びpCHOM2(Fv)₂を制限酵素Pvu
uIにて消化して直鎖状にし、これらをGene Pulser装置(BioRad 社製)を用い
てエレクトロポレーションによりCHO細胞にトランスフェクションした。DN

A (10 μ g) と、PBS中 1×10^7 細胞/mlの0.75 mlをキュベットに加え、1.5 kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸含有 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。一夜培養後、培養上清を除去し、PBSにてリンスした後、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製) を加え培養した。約2週間培養後、methotrexate (SIGMA 社製) を終濃度10 nMで含有する培地で更に培養し、その後50 nM、そして100 nMと濃度を順次上げて培養を続けた。こうして得られた細胞をローラーボトル中で無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.20 μ mフィルターにて濾過し、それぞれのCMを得た。

同様に、MABL2-scFv<HL-0, 3, 4, 6, 7>及び<LH-0, 3, 4, 5, 6, 7>を恒常的に発現するCHO細胞及びそれらのCMを得た。

15 6.9 MABL2-scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の精製

下記の2種類の精製法により前記6.8で得られたCMからMABL2-scFv<HL-5>及びsc(Fv)₂の精製を行った。

<精製法1> HL-5及びsc(Fv)₂を、そのポリペプチドのC末端のFlag配列を利用した抗Flag抗体アフィニティカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を用いて精製した。150 mM NaClを含む50 mM Tris塩酸緩衝液、pH 7.5 (TBS) で平衡化した抗Flag M2 Affinity gel (SIGMA) で作成したカラム (7.9 ml) に前記6.8で得られたCM (1 L) を添加し、TBSでカラムを洗浄後、0.1 Mグリシン塩酸緩衝液、pH 3.5でscFvをカラムから溶出させた。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、scFvの溶出を確認した。scFv画分を終濃度が0.01%となるようにTween 20を加え、Centricon-10 (ミリポア) で濃縮した。濃縮液を150 mM NaCl及び0.01% Tween 20を含む20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0で平衡化したTSK gel G3000SWカラム (7.5 \times 600 mm) にかけた。流速0.4

ml/minでscFvは280nmの吸収で検出した。HL-5は主要ピークとしてダイマーの位置に、sc(Fv)₂はモノマーの位置にそれぞれ溶出された。

5 <精製法2> HL-5及びsc(Fv)₂をイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三工程で精製した。イオン交換クロマトグラフィーでは、HL-5ではQ Sepharose fast flow カラム（ファルマシア）をsc(Fv)₂ではSP-sepharose fast flow カラムを用い、第二工程以降はHL-5とsc(Fv)₂で同じ条件を用いた。

（第一工程）HL-5

10 HL-5のCMは、0.02%Tween 20を含む20mM Tris 塩酸緩衝液、pH9.0で2倍希釈した後に、1M TrisでpHを9.0に調整した。この後、0.02%Tween 20を含む20mM Tris 塩酸緩衝液、pH8.5で平衡化したQ Sepharose fast flow カラムにかけ、同緩衝液中0.1Mから0.55MまでのNaClの直線濃度勾配でカラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、HL-5を含む画分を集め、第
15 二工程のハイドロキシアパタイトにかけた。

（第一工程）sc(Fv)₂

sc(Fv)₂のCMは、0.02%Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH5.5で2倍希釈した後に、1M酢酸でpHを5.5に調整した。0.02%Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH5.5で平衡化したSP-Sepahrose
20 fast flow カラムにかけ、同緩衝液中、NaCl濃度を0から0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、sc(Fv)₂を含む画分を集め、第二工程のハイドロキシアパタイトにかけた。

（第二工程）HL-5及びsc(Fv)₂のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー
25

第一工程で得られたHL-5画分及びsc(Fv)₂画分をそれぞれ0.02% Tween 20を含む10mM リン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム（BioRad、タイプI）に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄

後、リン酸緩衝液濃度を0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。各画分をSDS/PAGEで分析し、所望のポリペプチドが含まれる画分を集めた。

(第三工程) HL-5及びsc(Fv)₂のゲル濾過

5 第二工程で得られた各画分をそれぞれ Centriprep-10 (ミリポア) で濃縮し、0.02% Tween 20及び0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液、pH6.0で平衡化したSuperdex 200カラム (2.6×60cm、ファルマシア) にかけた。HL-5はダイマーに位置に、sc(Fv)HL-5及びsc(Fv)₂はモノマーの位置にそれぞれ主要ピークとして溶出された。

10 いずれの精製法においても、HL-5モノマーは殆ど検出されなかったことから、一本鎖Fvのリンカーのアミノ酸残基数が5個程度であれば、効率的に一本鎖Fvのダイマーが形成できることが判明した。HL-5ダイマーおよびsc(Fv)₂はいずれも精製された後も4℃で1ヶ月間安定的に維持された。

6. 10 精製scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の抗原結合活性

15 評価

精製されたMABL2-scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、フローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 (hIAP/L1210) 又は対照としてpCOS1ベクターをトランスフェク
20 クションしたL1210細胞 (pCOS1/L1210) 2×10⁵個に、10μg/mLの精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー、MABL2-sc(Fv)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体MABL-2、陰性対照としてマウスIgG (Zymed 社製) を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、10μg/mLのマウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベ
25 ション及び洗浄の後、FITC標識抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

その結果、精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー及びMABL2-

$sc(Fv)_2$ はhIAP/L1210細胞に特異的に結合したことにより、 $scFv<HL5>$ のダイマー及び $sc(Fv)_2$ がヒトIAPに対して高い親和性を有することが示された(図42)。

6. 1 1 精製 $scFv<HL-5>$ のダイマー及び $sc(Fv)_2$ の in vitro アポトーシス誘起効果

精製したMABL2- $scFv<HL5>$ のダイマー及び $sc(Fv)_2$ について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(hIAP/L1210)及びヒト白血病細胞株CCRF-CEMに対するアポトーシス誘導作用をAnnexin-V(BOEHRINGER MANNHEIM社製)染色により検討した。

- 10 hIAP/L1210細胞 5×10^4 個あるいはCCRF-CEM細胞 1×10^5 個に、精製MABL2- $scFv<HL5>$ のダイマー、MABL2- $sc(Fv)_2$ 、陽性対照としてモノクローナル抗体MABL-2、陰性対照としてマウスIgGを様々な濃度で添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V染色を行い、FACSscan装置(BECTON DICKINSON社製)にて蛍光強度を測定
- 15 した。その結果、MABL2- $scFv<HL5>$ のダイマー及びMABL2- $sc(Fv)_2$ はhIAP/L1210、CCRF-CEMの両細胞に対して濃度依存的に細胞死を誘導した(図43)。

6. 1 2 精製 $scFv<HL-5>$ のダイマー及び $sc(Fv)_2$ の赤血球凝集試験

- 20 実施例5. 15に従って、種々の濃度の精製した $scFv<HL-5>$ のダイマー及び $sc(Fv)_2$ の血液凝集試験を実施した。

- モノクローナル抗体MABL-2(陽性対照)では血液凝集が起こるのに対して、一本鎖抗体のMABL2- $sc(Fv)_2$ 及びMABL2- $sc(Fv)<HL5>$ は凝集しなかった。また、MABL-2抗体を用いた緩衝液の差もほとんどみられなかった。その結果を下記の表3に示す。
- 25

表 3

ヒト赤血球凝集試験

| 希釈液: PBS | | | | | | | | | | | | | | | ($\mu\text{g/ml}$) | |
|---------------------|------|------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------------|--------|
| MABL2-sc(Fv)2 | cont | 28.9 | 14.45 | 7.225 | 3.6125 | 1.8063 | 0.9031 | 0.4516 | 0.2258 | 0.1129 | 0.0564 | 0.0282 | 0.0141 | 0.0071 | 0.0035 | 0.0018 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MABL2-sc(Fv)<HL5> | cont | 28.0 | 14.0 | 7.0 | 3.5 | 1.75 | 0.875 | 0.4375 | 0.2188 | 0.1094 | 0.0547 | 0.0273 | 0.0137 | 0.0068 | 0.0034 | 0.0017 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MABL2 (intact) | cont | 80 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.3125 | 0.1563 | 0.0781 | 0.0391 | 0.0195 | 0.0098 | 0.0049 |
| | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ± | - | - | - | - | - |
| mIgG | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 希釈液: Acetate Buffer | | | | | | | | | | | | | | | ($\mu\text{g/ml}$) | |
| MABL2 (intact) | cont | 80 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | 0.3125 | 0.1563 | 0.0781 | 0.0391 | 0.0195 | 0.0098 | 0.0049 |
| | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

6. 13 精製 s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ のヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

実施例 6. 8 及び 6. 9 にて作製、精製した s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ について、その抗腫瘍効果を試験した。具体的には実施例 5. 1 4 (3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルを用いて、マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生する M タンパク質を E L I S A により定量し、併せてマウスの生存日数を記録した。そして、血清中の M タンパク質量の変化および生存日数により、s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の抗腫瘍効果を評価した。

なお、本試験において H L - 5 及び s c (F v)₂ は、v e h i c l e (1 5 0 m M N a C l , 0 . 0 2 % T w e e n 及び 2 0 m M 酢酸緩衝液, p H 6 . 0) 中の 0 . 0 1 , 0 . 1 又は 1 m g / m L の溶液として、投与量が 0 . 1 , 1 または 1 0 m g / k g になるようにマウスに投与した。また、対照は v e h i c l e のみを投与した。

ヒト骨髓腫細胞移植後 2 6 日目に血清を採取し、血清中の M タンパク質量を E L I S A により実施例 5. 1 4 に従って測定した。その結果、H L - 5 投与群及びダイマー及び s c (F v)₂ 投与群共に、血清中の M タンパク質量が投与量依存的に減少していた (図 4 4 を参照) 。また、その生存期間については、H L - 5 投与群 (図 4 5) 及び s c (F v)₂ 投与群 (図 4 6) 共に対照 (v e h i c l e 投与群) と比較して有意な生存期間の延長が観察された。これらの結果は、本発明の H L - 5 及び s c (F v)₂ がインビボにおいても優れた抗腫瘍作用を有することを示している。

図面の簡単な説明

図 1. ヒト I g G 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 2. キメラ M A B L - 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞 (h

IAP/L1210) に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図3. キメラMABL-2抗体が、ヒトIAPを発現するL1210細胞(h IAP/L1210) に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図4. 本発明にかかる一本鎖Fvの作成方法を模式的に示す図である。

図5. 本発明の一本鎖FvをコードするDNAを、大腸菌にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

図6. 本発明の一本鎖FvをコードするDNAを、哺乳動物細胞にて発現させるために使用する発現プラスミドの一例の構造を示す。

図7. 実施例5. 4で得られたウエスタンブロットの結果を示す写真である。左側より、分子量マーカー(上から97.4、66、45、31、21.5、14.5 kDaを示す)、pCHO1導入COS7細胞培養上清、pCHOM2導入細胞培養上清。pCHOM2導入細胞培養上清に再構成MABL-2抗体一本鎖Fv(矢印)が明らかに含まれていることを示す。

図8. コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清の抗体は、コントロールとしてのpCOS1/L1210細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図9. MABL2-scFv/COS7細胞培養上清の抗体は、コントロールとしてのpCOS1/L1210細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図10. コントロールとしてのpCOS1/COS7細胞培養上清の抗体は、h IAP/L1210細胞に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図11. MABL2-scFv/COS7細胞培養上清の抗体は、h IAP/L1210細胞に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図12. 実施例5. 6で示すCompetitive ELISAの結果を示す

図であり、本発明の一本鎖Fv (MABL2-s c Fv) の抗原結合活性を、コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清と比較して、マウスモノクローナル抗体MABL-2の抗原結合に対する阻害を指標として示す図である。

図13. 実施例5. 7のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、コントロールとしてのpCOS1/L1210細胞には、コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図14. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、コントロールとしてのpCOS1/L1210細胞には、MABL2-s c Fv/COS7細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図15. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、hIAP/L1210細胞には、コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図16. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、hIAP/L1210細胞に対し、MABL2-s c Fv/COS7細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す。

図17. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞には、コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す (最終濃度50%)。

図18. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞に対し、MABL2-s c Fv/COS7細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す (最終濃度50%)。

図19. 実施例5. 9のCHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製過程において、Blue-sepharose カラムで得られた画分をハイドロキシアパタイトカラムを用いて精製した際のクロマトグラムを示す図であり、主要なピークとして画分A、画分Bが得られたことを示す。

図20. 実施例5. 9の(2)で得られた画分A、画分Bについてゲル濾過により精製した結果を示す図であり、画分Aでは見かけ上の分子量約36kD、画分Bでは同76kDの位置に主要ピークが (それぞれA I 及びB I) が溶出したこ

とを示す。

図 2 1. 実施例 5. 9 の CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 F_v の精製過程において得られた画分を SDS-PAGE で分析した図であり、何れも分子量約 35 kD に単一のバンドのみであることを示す。

- 5 図 2 2. CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 F_v の精製において得られた画分 A I 及び B I をゲル濾過により分析した結果を示す図であり、画分 A I はモノマーからなり、画分 B I はダイマーからなることを示す。

図 2 3. 本発明の一本鎖 F_v をコードする DNA を、大腸菌の菌体内にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

- 10 図 2 4. 実施例 5. 12 の大腸菌細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 F_v ポリペプチドの精製において、得られた粗製物をゲル濾過カラムを用いて精製した結果を示す図であり、各ピークはそれぞれ大腸菌細胞産生の一本鎖 F_v のモノマー、ダイマーを示す。

- 15 図 2 5. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞には、コントロールとしてのマウス I g G 抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 3 μg / ml）。

図 2 6. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞に対し、CHO 細胞産生の MABL 2 - s c F_v ダイマーが顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 3 μg / ml）。

- 20 図 2 7. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞に対し、大腸菌細胞産生の MABL 2 - s c F_v ダイマーが顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 3 μg / ml）。

- 25 図 2 8. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞には、CHO 細胞産生の MABL 2 - s c F_v モノマーのアポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 3 μg / ml）。

図 2 9. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞には、大腸菌細胞産生の MABL 2 - s c F_v モノマーのア

ポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 30. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞には、コントロールとしてのマウス I g G 抗体は抗 F L A G 抗体の添加によってもアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 31. 実施例 5. 13 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞に対し、CHO 細胞産生の M A B L 2 - s c F v モノマーが抗 F L A G 抗体の添加によって顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 32. ヒト骨髓腫細胞株 K P M M 2 を移植したマウスの血清中のヒト I g G 量を定量したものであり、マウスにおけるヒト骨髓腫により産生されるヒト I g G の量を測定した結果を示す図であり、s c F v / C H O ダイマーが K P M M 2 細胞の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図 33. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、s c F v / C H O ダイマー投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図 34. M A B L - 2 抗体由来の 2 つの H 鎖 V 領域及び 2 つの L 鎖 V 領域を含む再構成ポリペプチド $[\text{s c}(\text{F v})_2]$ を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 35. [H 鎖] - [L 鎖] となるように V 領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない s c F v (H L タイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 36. H L タイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

図 37. [L 鎖] - [H 鎖] となるように V 領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない s c F v (L H タイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 38. L H タイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

図 39. 実施例 6. 4 におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図であり、2 つの H 鎖 V 領域及び 2 つの L 鎖 V 領域を含む再構成ポリペプチド $\text{s c}(\text{F v})_2$ 及

び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 scFvが発現していることを示す。

図40a及びb. 実施例6. 3 (1) にて調製したCOS7細胞培養上清を用いたフローサイトメトリーの結果を示す図であり、種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL2-scFv及びsc(Fv)₂は、ヒトIAPに対して高い親和性を有することを示す。

図41. 実施例6. 6のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、scFv<HL3, 4, 6, 7, LH3, 4, 6, 7>及びsc(Fv)₂はhIAP/L1210細胞に対して顕著な細胞死を誘導することを示す。

図42. 実施例6. 10の抗原結合評価の結果を示す図であり、scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂がヒトIAPに対して高い親和性を有することを示す。

図43. 実施例6. 11のin vitro アポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、MABL2-scFv<HL5>のダイマー及びMABL2-sc(Fv)₂はhIAP/L1210、CCRF-CEMの両細胞に対して濃度依存的に細胞死を誘導することを示す。

図44. ヒト骨髓腫細胞株KPMM2を移植したマウスにおけるヒト骨髓腫により産生される血清中のMタンパク質の量を測定した結果を示す図であり、scFv<HL-5>及びsc(Fv)₂がKPMM2細胞の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図45. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、scFv<HL-5>投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図46. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、sc(Fv)₂投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

産業上の利用可能性

本発明の再構成ポリペプチドは、ヒトIAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさないという特性を有していることから、

急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髄腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫（Hodgkin 病、非 Hodgkin リンパ腫）、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、真性多血症などの血液疾患の治療薬として有用である。

請求の範囲

1. Integrin Associated Protein (IAP) に結合し、IAPを有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起し、且つ赤血球凝集を起こさない再構成ポリペプチド。
- 5 2. 再構成ポリペプチドが改変抗体である請求項1に記載の再構成ポリペプチド。
3. 改変抗体が、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む請求項2に記載の再構成ポリペプチド。
4. 再構成ポリペプチドが、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一
10 本鎖F_vのダイマーである請求項3記載の再構成ポリペプチド。
5. 再構成ポリペプチドが、精製された一本鎖F_vのダイマーである請求項1～4のいずれか1項に記載の再構成ポリペプチド。
6. 再構成ポリペプチドが、2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである請求項3記載の再構成ポリペプチド。
- 15 7. H鎖V領域及びL鎖V領域が、少なくとも1個以上のアミノ酸からなるペプチドリンカーを介して連結されている、請求項5又は6記載の再構成ポリペプチド。
8. 請求項4、5又は7に記載の一本鎖F_vをコードするDNA。
9. 請求項6又は7に記載のポリペプチドをコードするDNA。
- 20 10. H鎖V領域及び／又はL鎖V領域がヒト型化H鎖V領域及び／又はL鎖V領域である請求項1～3のいずれか1項に記載の再構成ポリペプチド。
11. 請求項10に記載のポリペプチドをコードするDNA。
12. 請求項1、2、3、4、5、6、7又は10に記載の再構成ポリペプチドを産生する動物細胞。
- 25 13. 請求項1、2、3、4、5、6、7又は10に記載の再構成ポリペプチドを産生する微生物。
14. 請求項1、2、3、4、5、6、7又は10に記載の再構成ポリペプチド

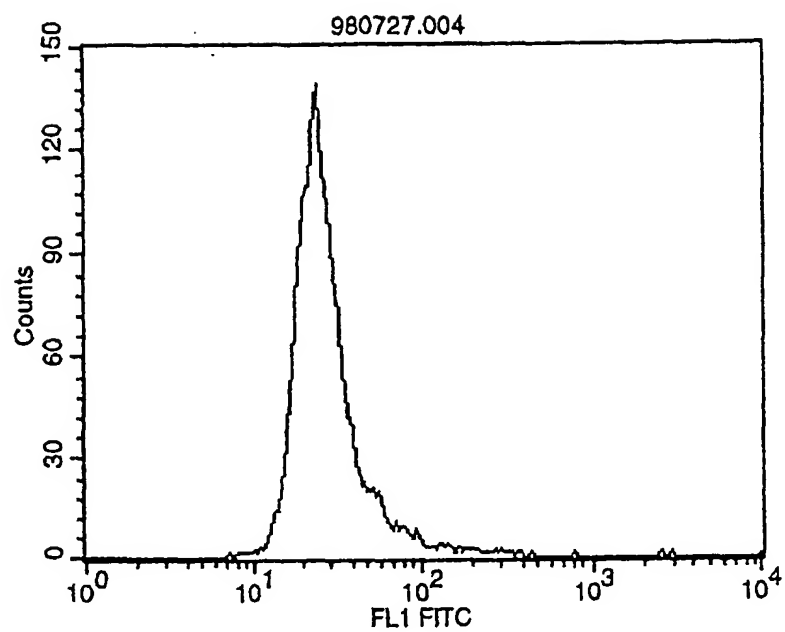
を有効成分として含有する血液疾患治療薬。

15. 前記血液疾患が、白血病であることを特徴とする請求項14記載の血液疾患治療薬。

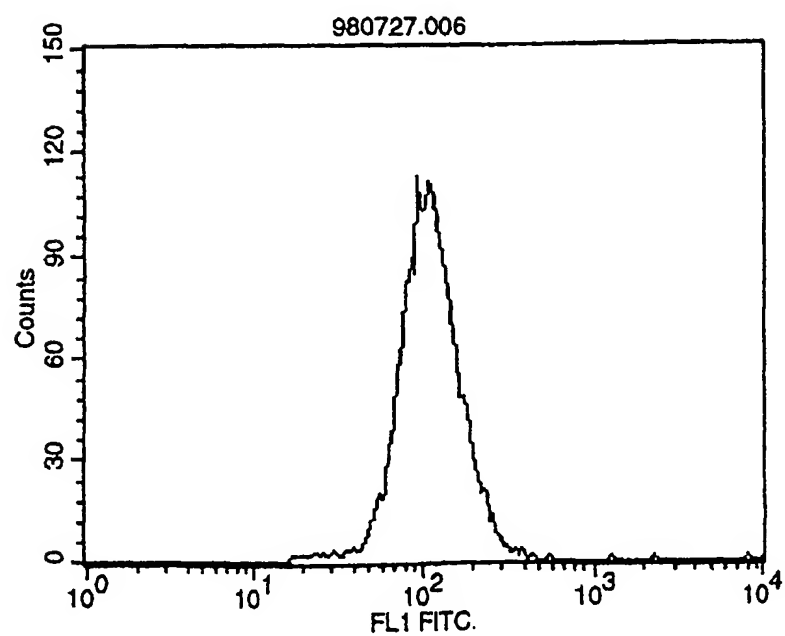
16. 有効成分が、請求項4、5又は7に記載の一本鎖Fvであることを特徴とする請求項14に記載の血液疾患治療薬。

1/38

☒ 1



☒ 2



2/38

3

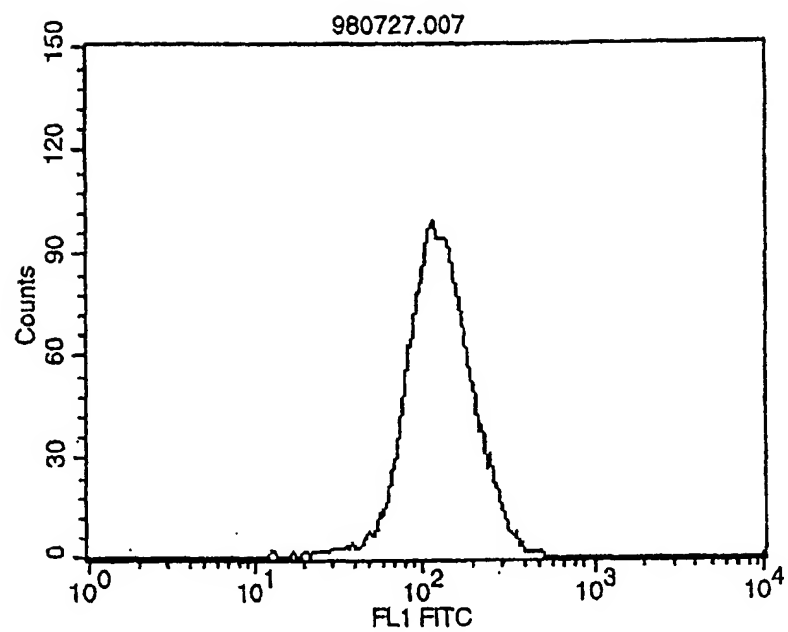
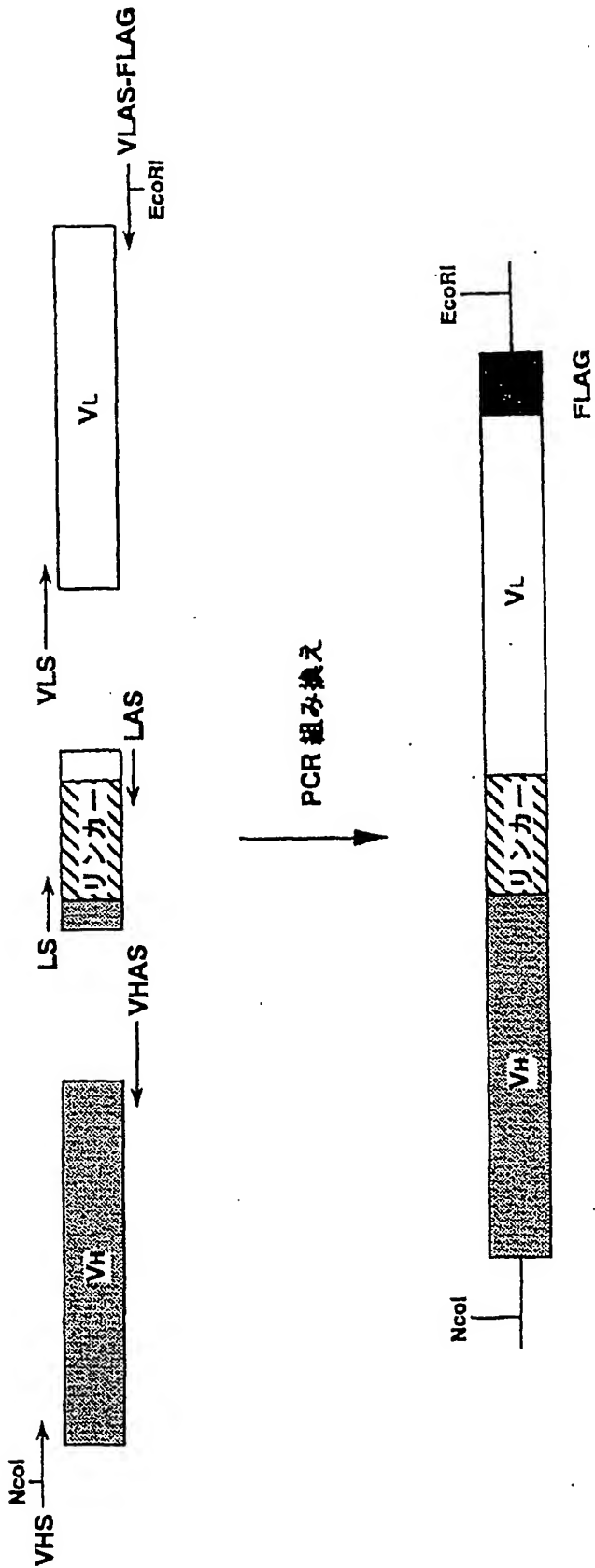


図 4

3/38



5

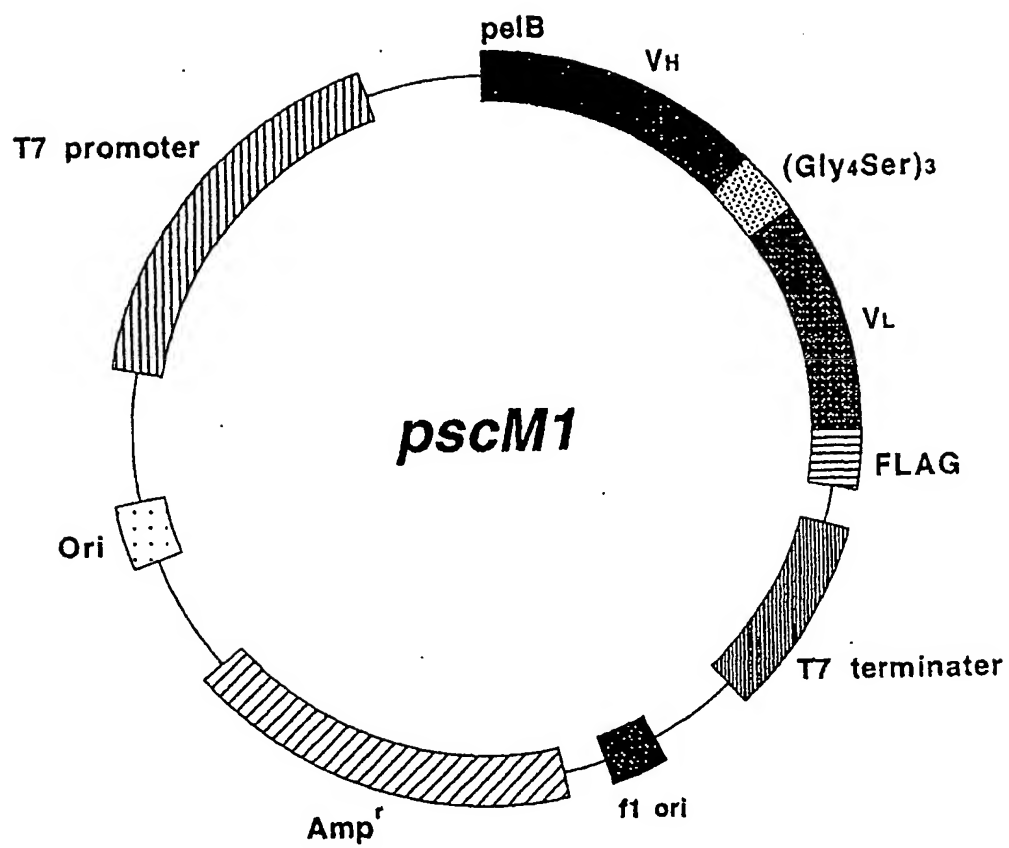
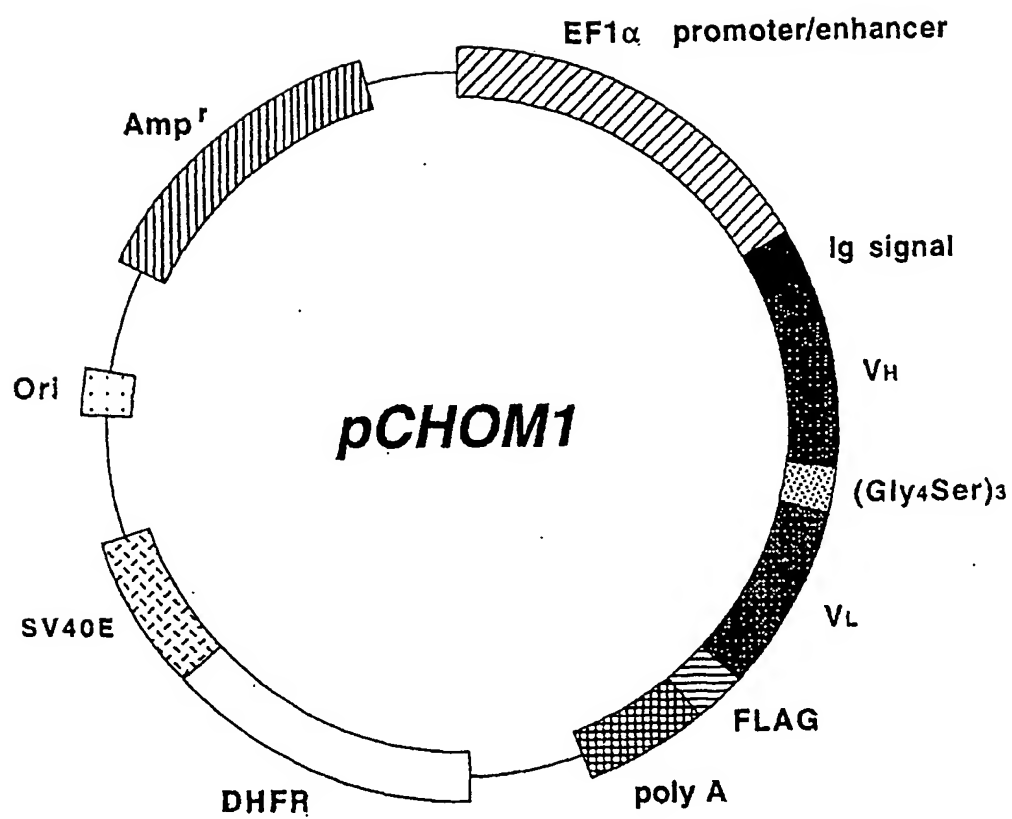
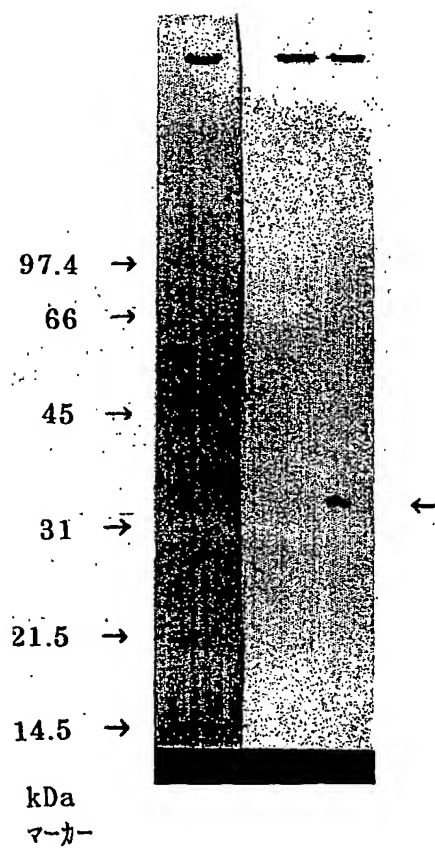


图 6



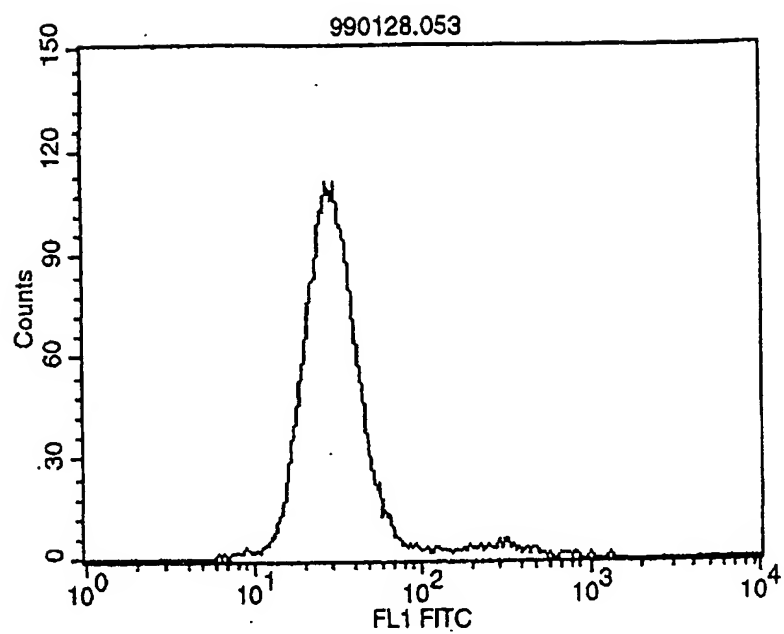
6/38

図 7

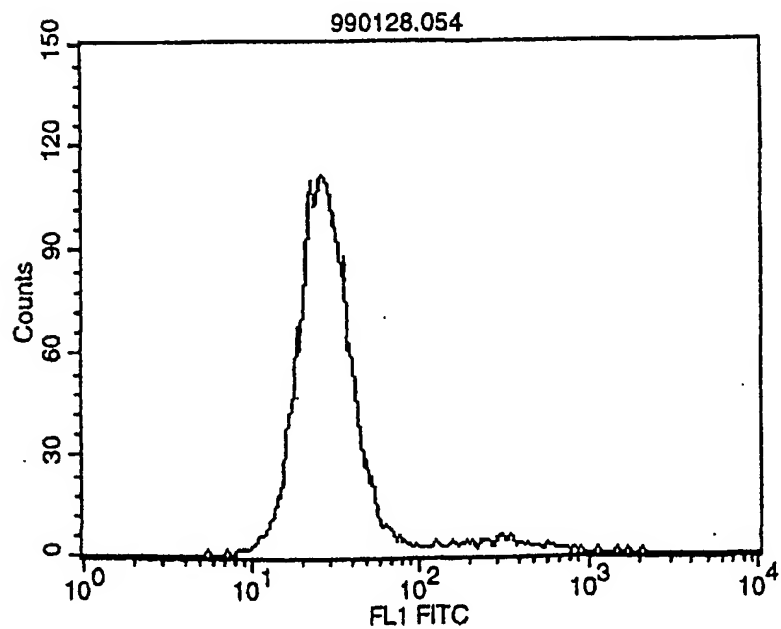


7/38

☒ 8



☒ 9



8/38

図 1 0

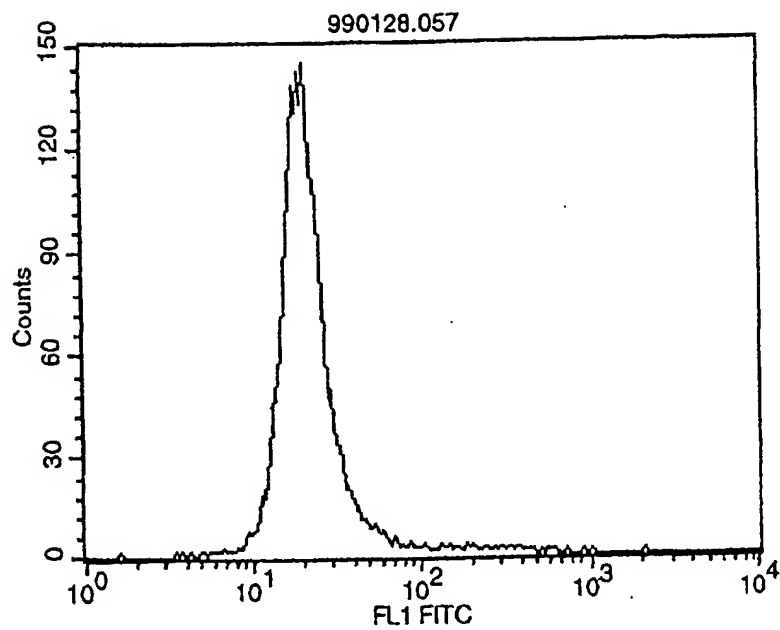
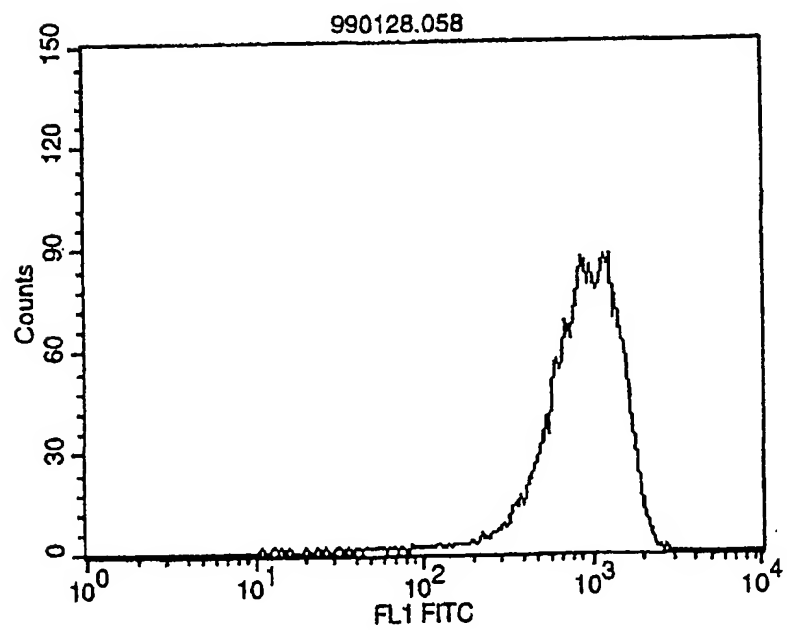


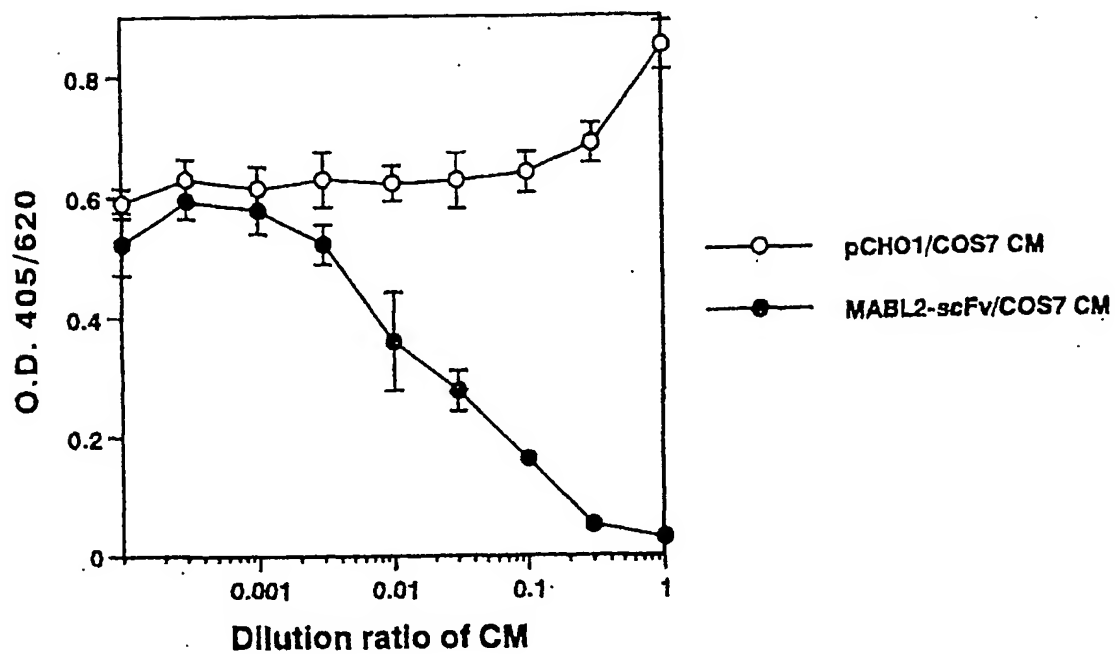
図 1 1



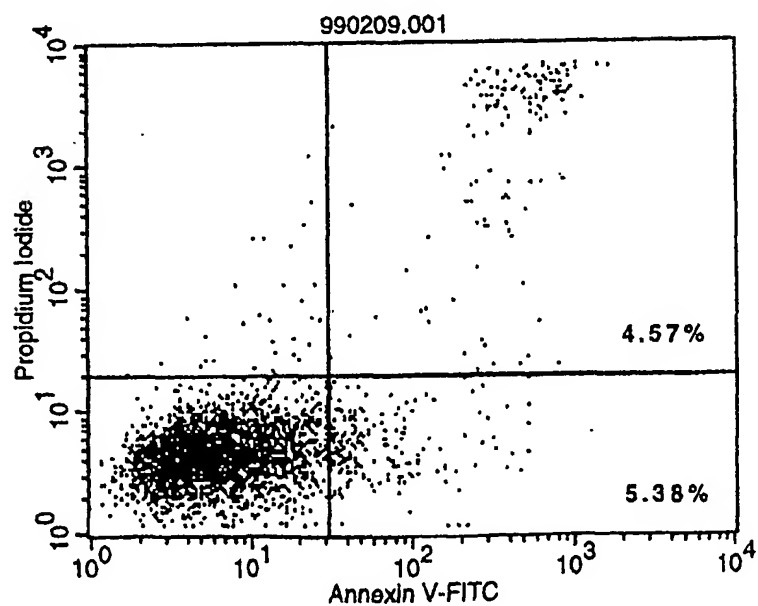
1 2

9/38

Competitive ELISA



1 3



10/38

図 1 4

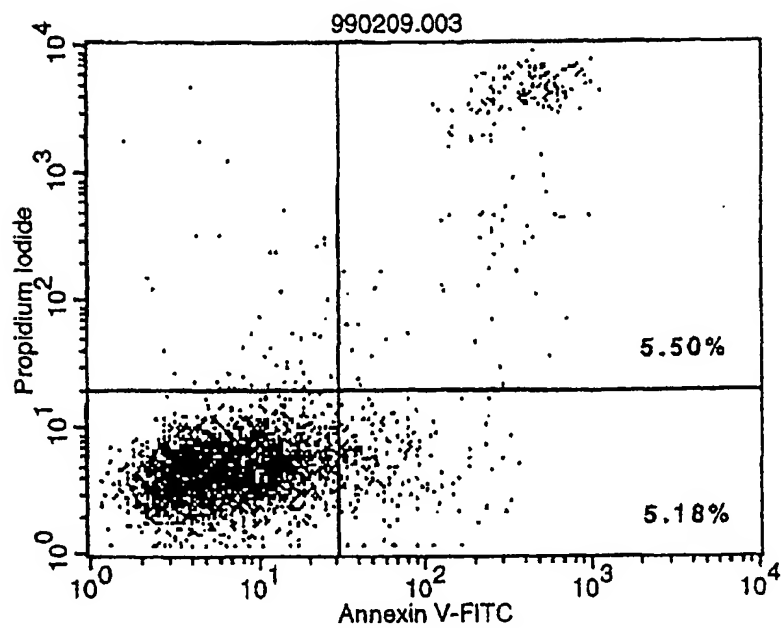
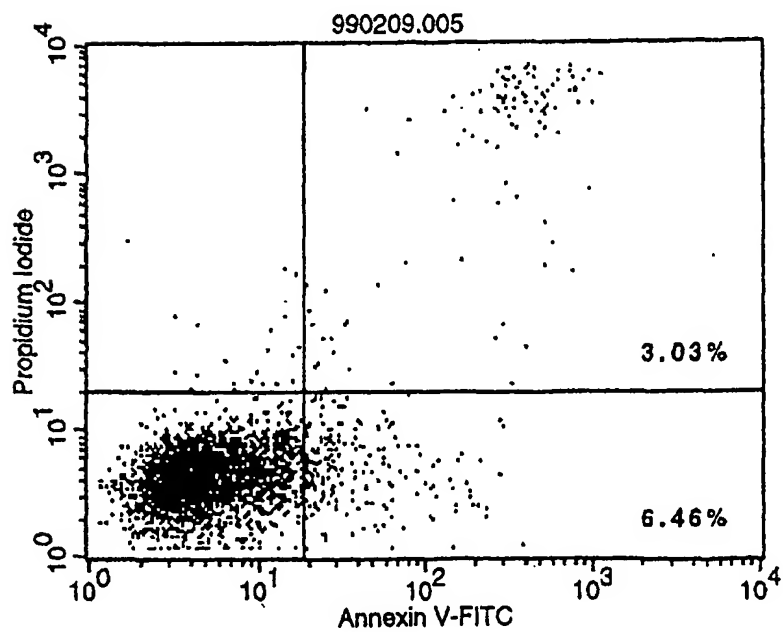


図 1 5



11/38

図 1 6

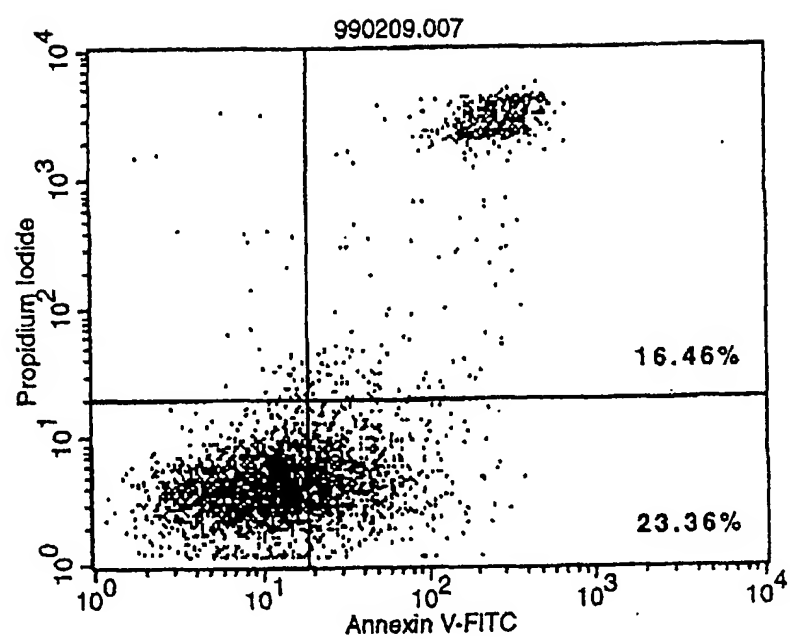
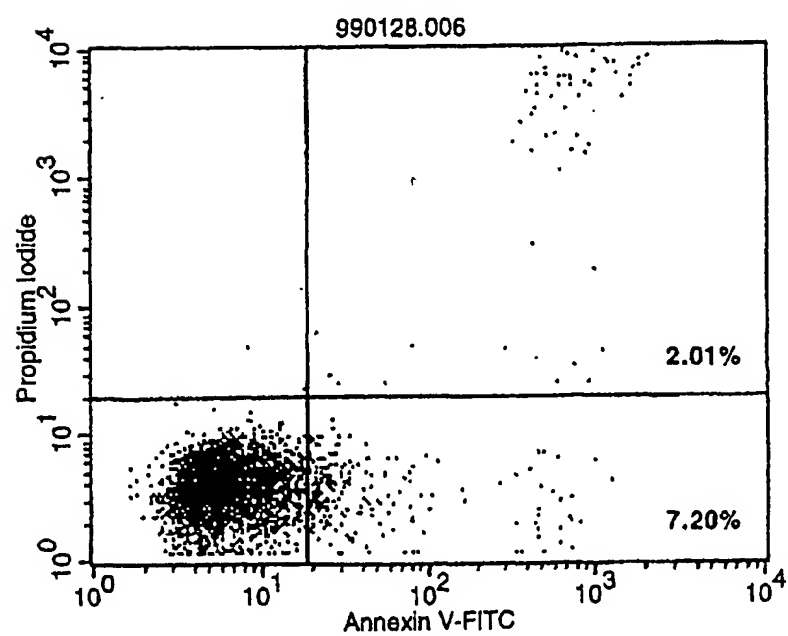
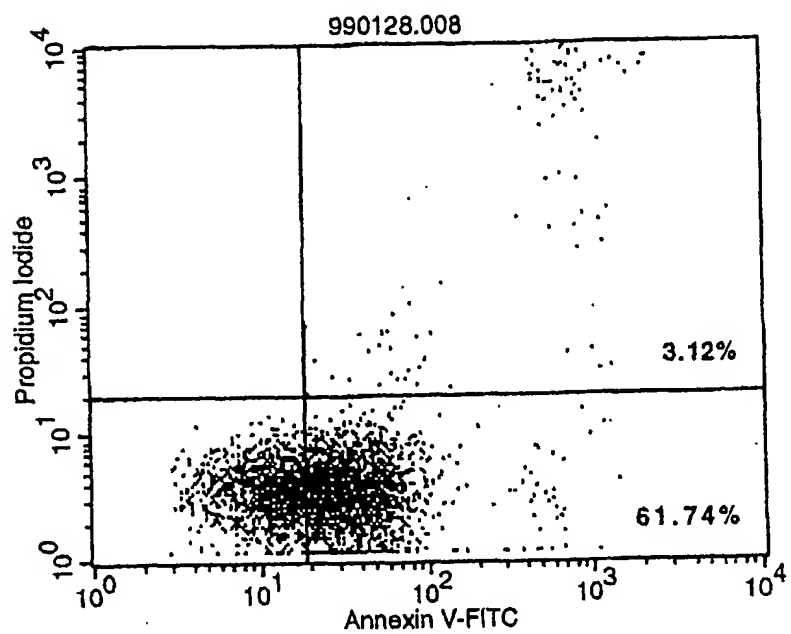


図 1 7



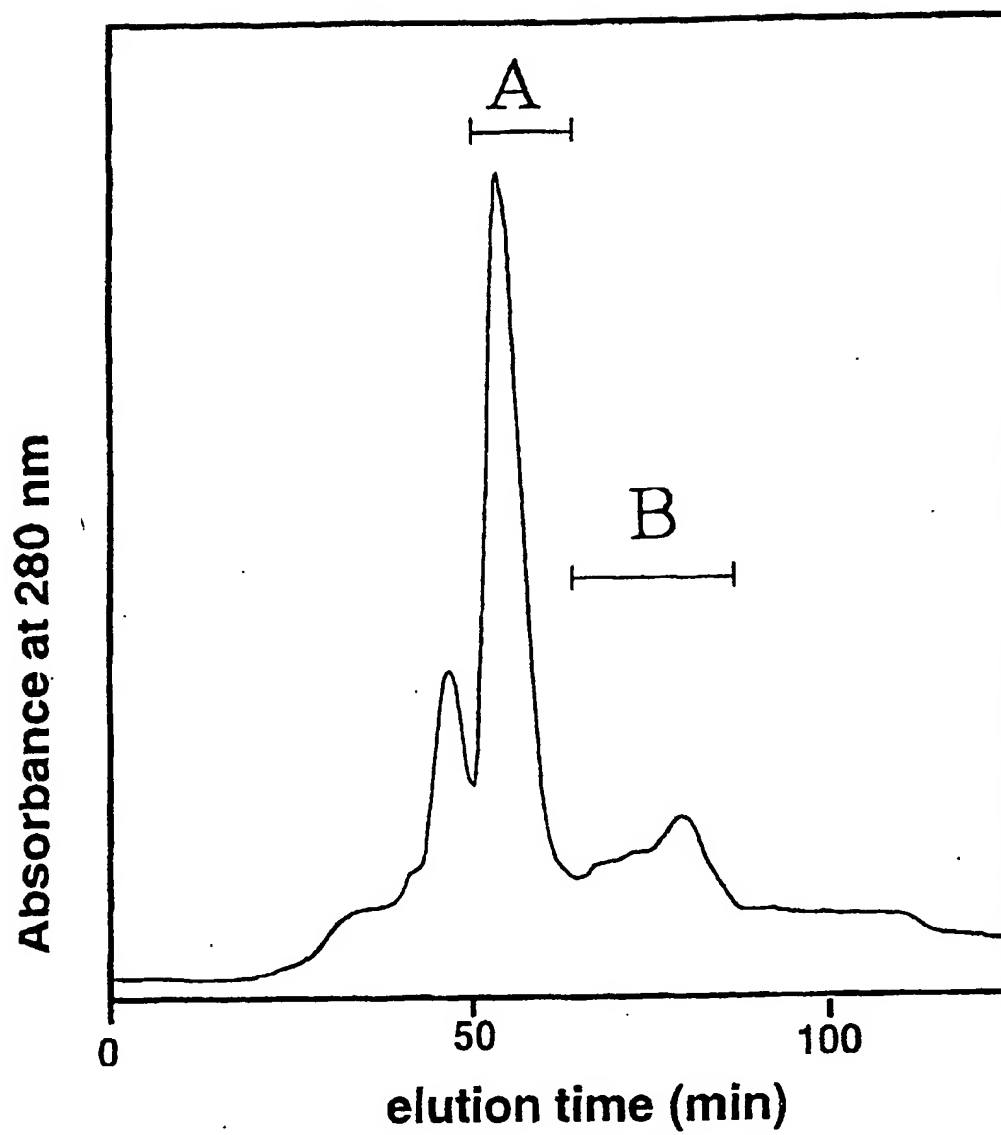
12/38

18



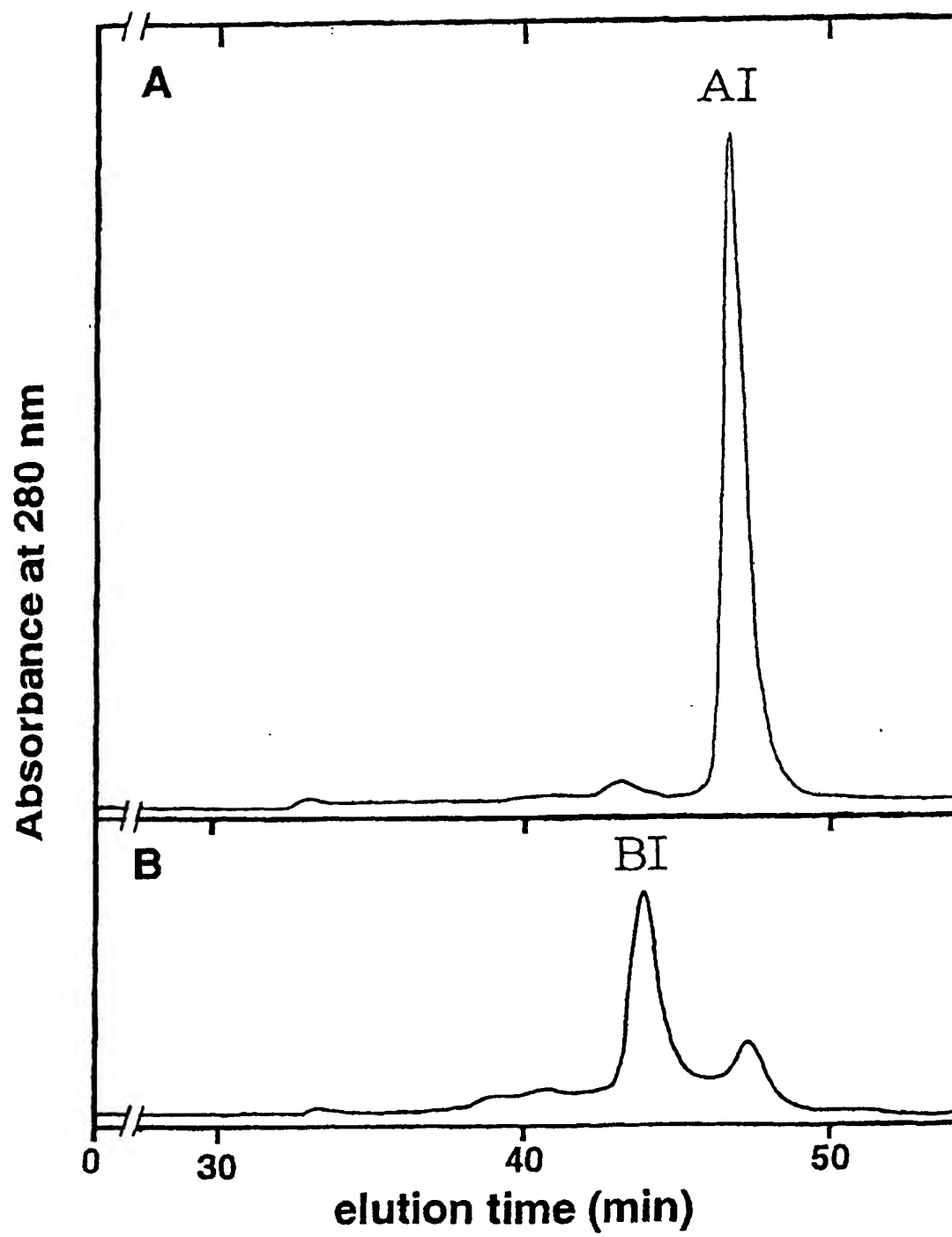
13/38

☒ 19



14/38

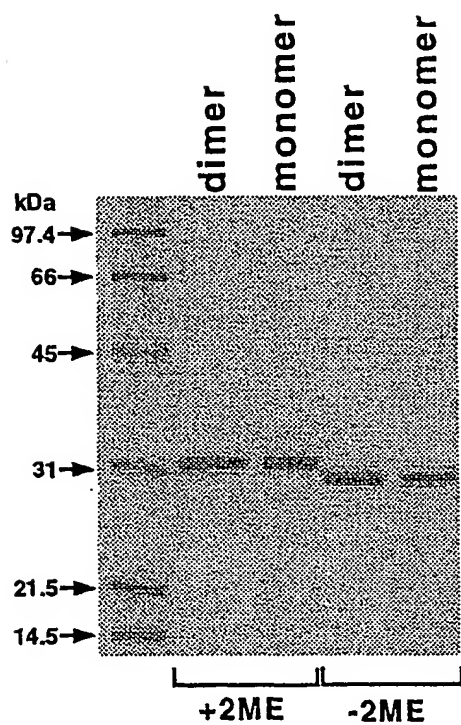
図 20



21

SDS-PAGE analysis of MABL2-scFv

<CHO>



<E. coli>

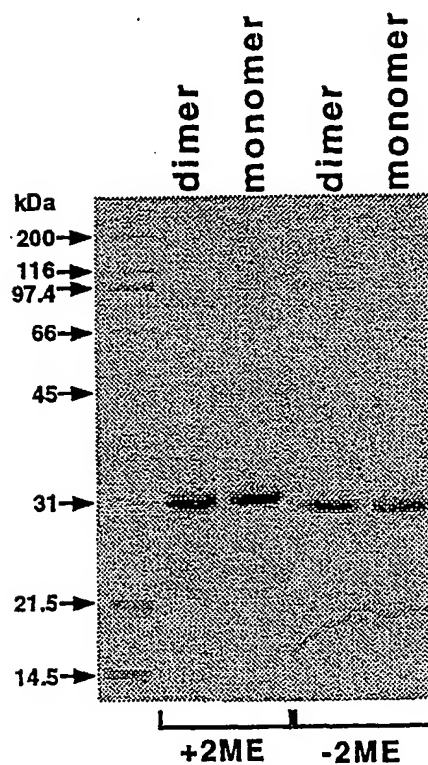


図 22

TSK gel G3000SW

20 mM Acetate buffer, 0.15 M NaCl, pH 6.0

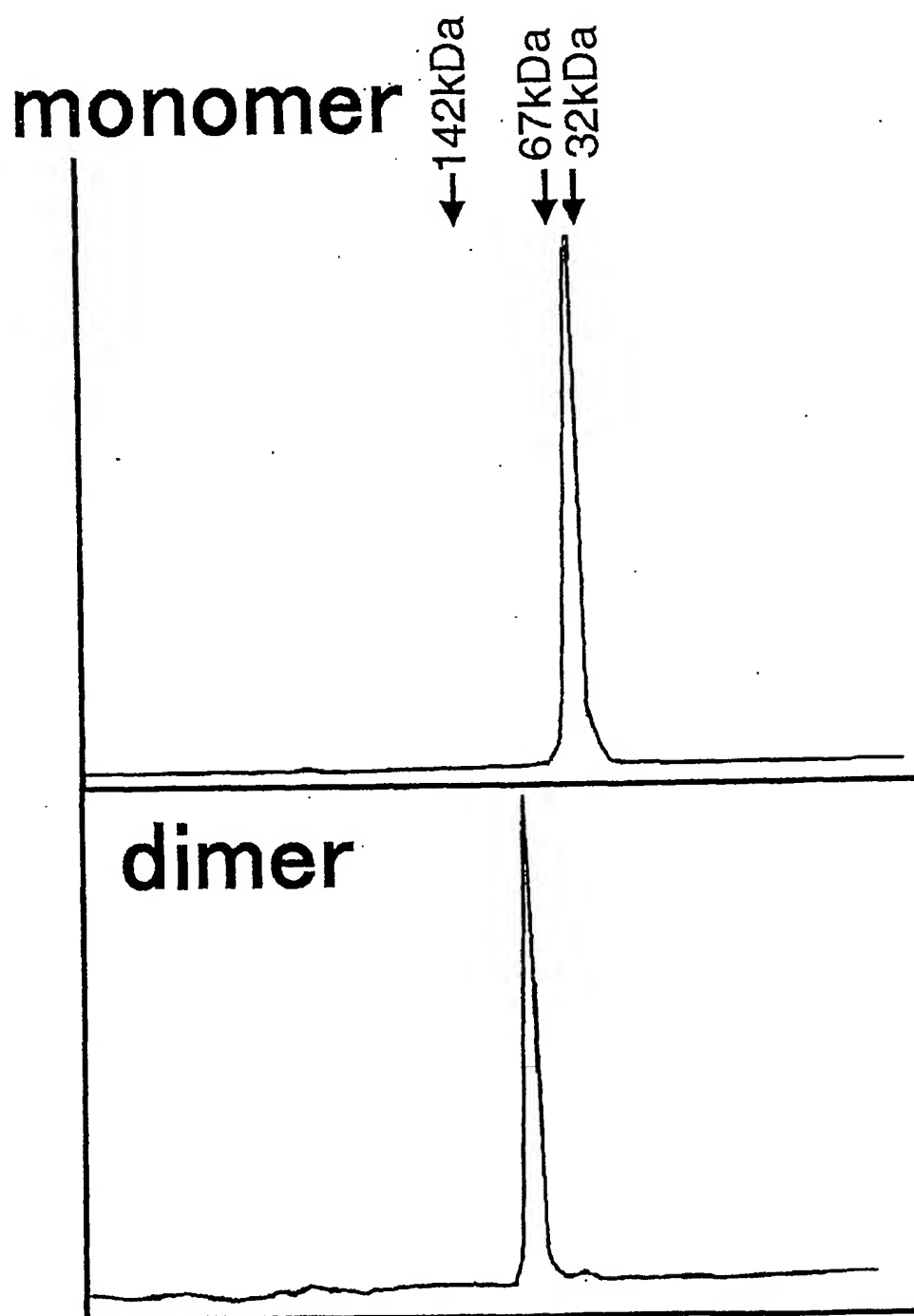
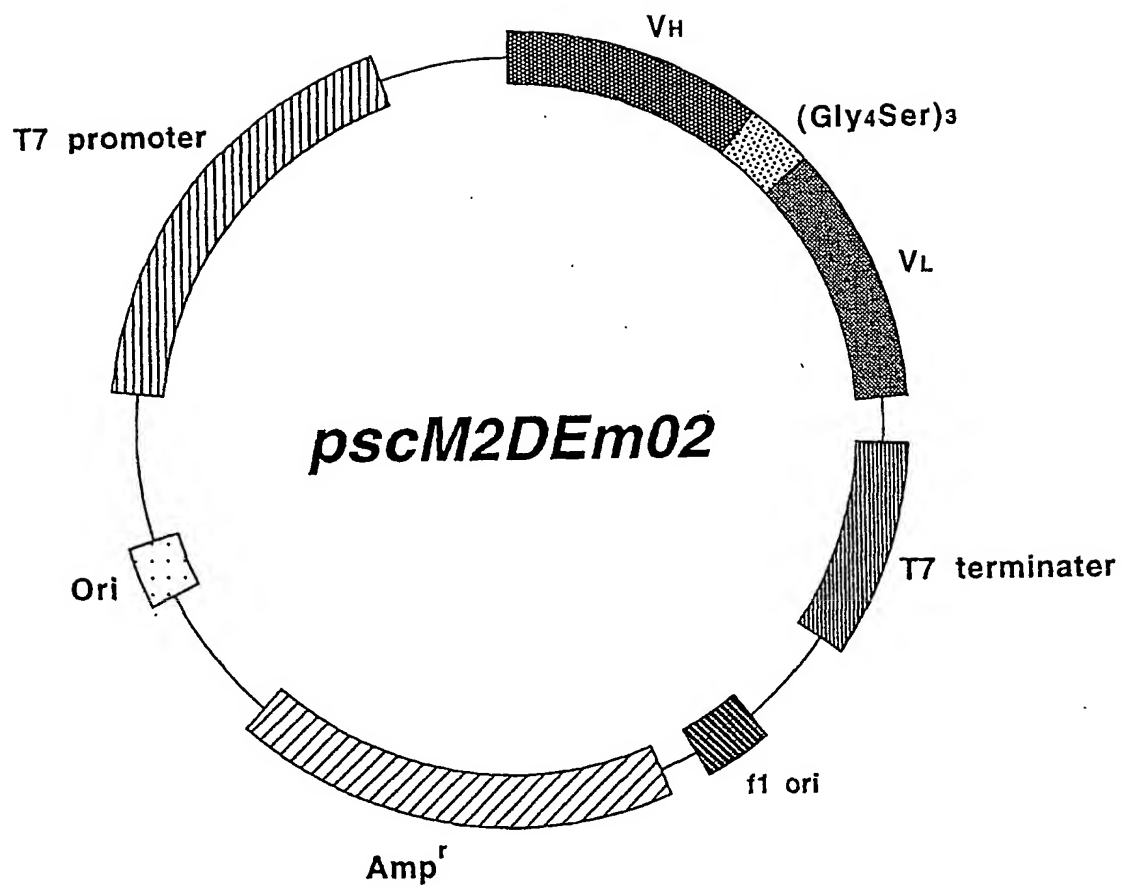
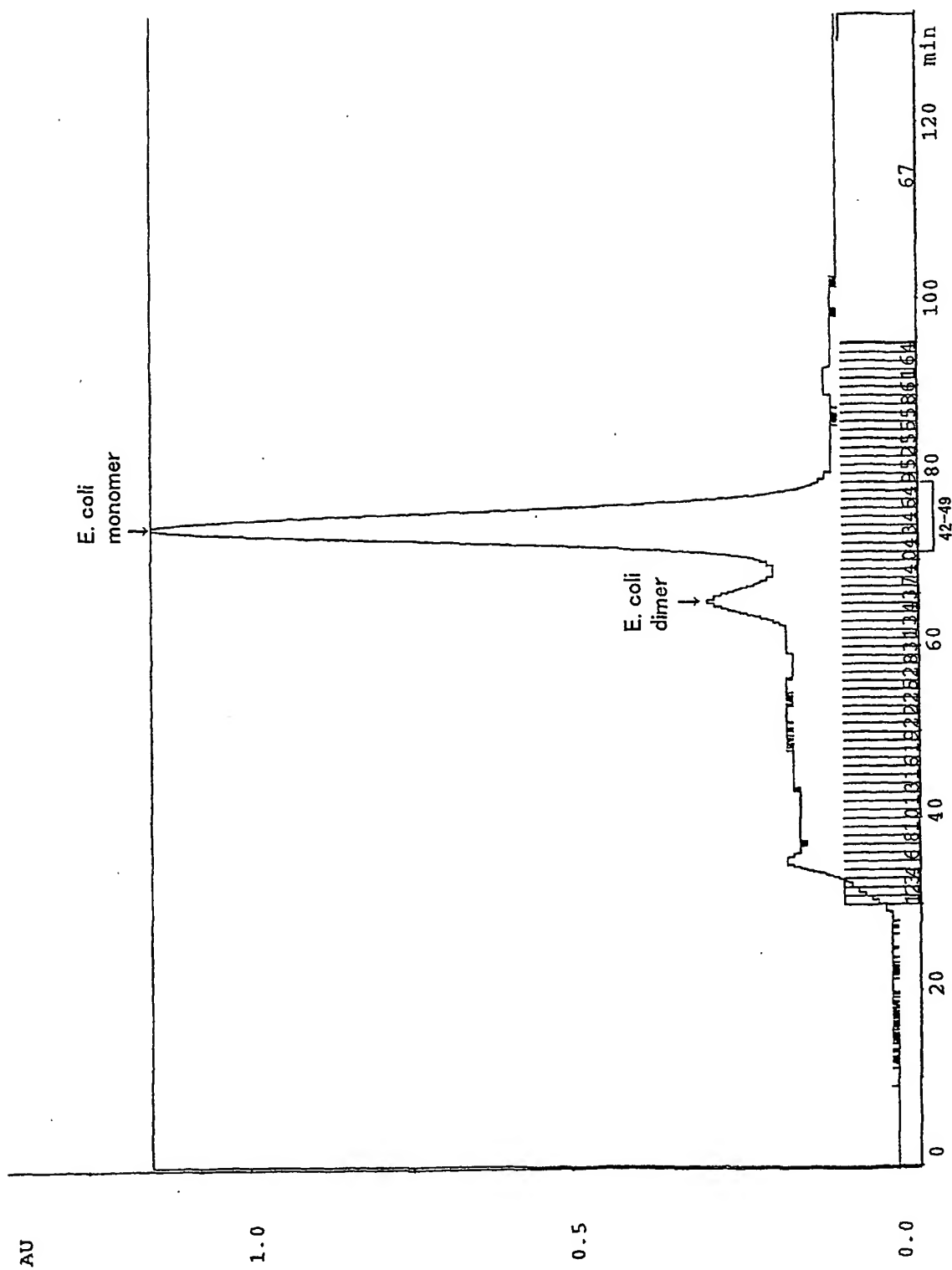


図 23



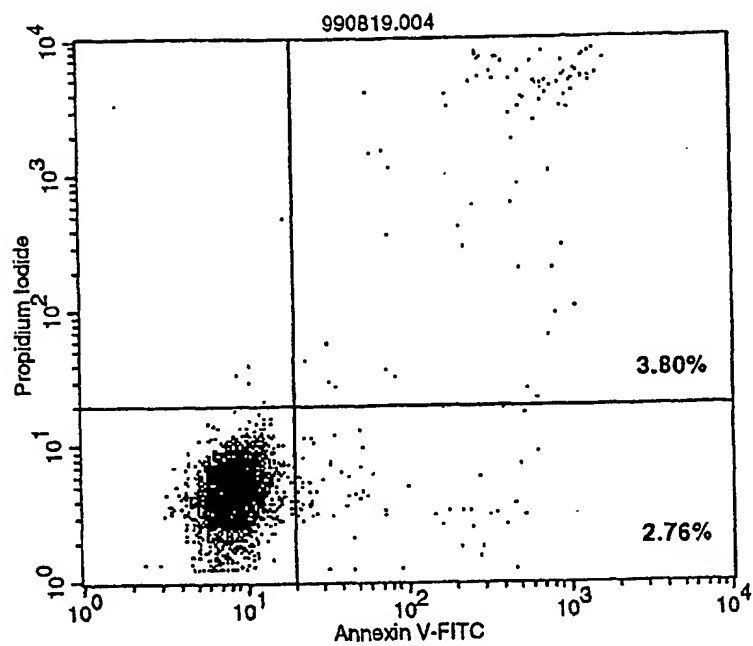
18/38

24

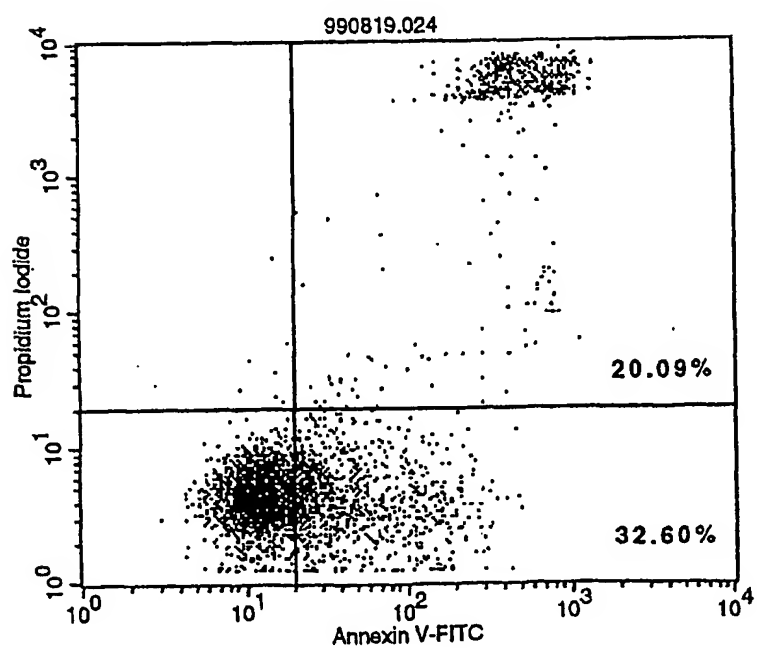


19/38

25



26



20/38

図 27

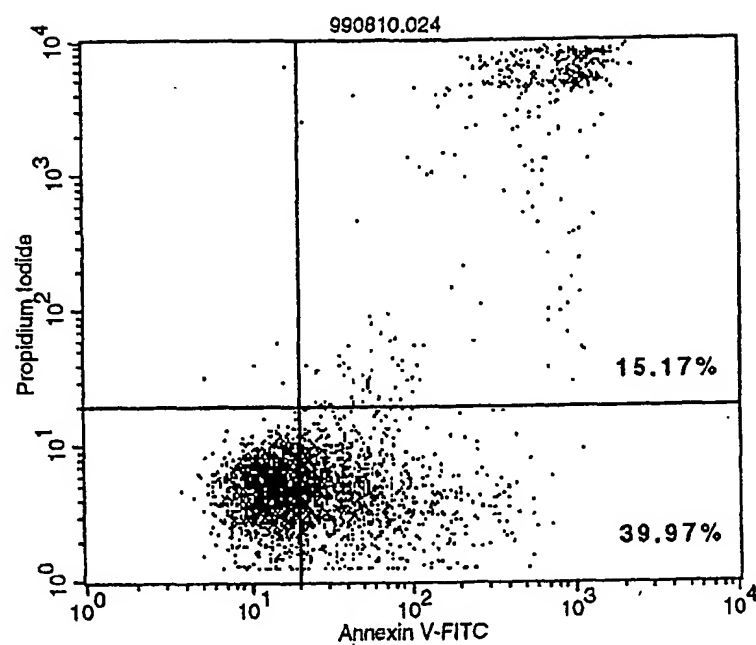
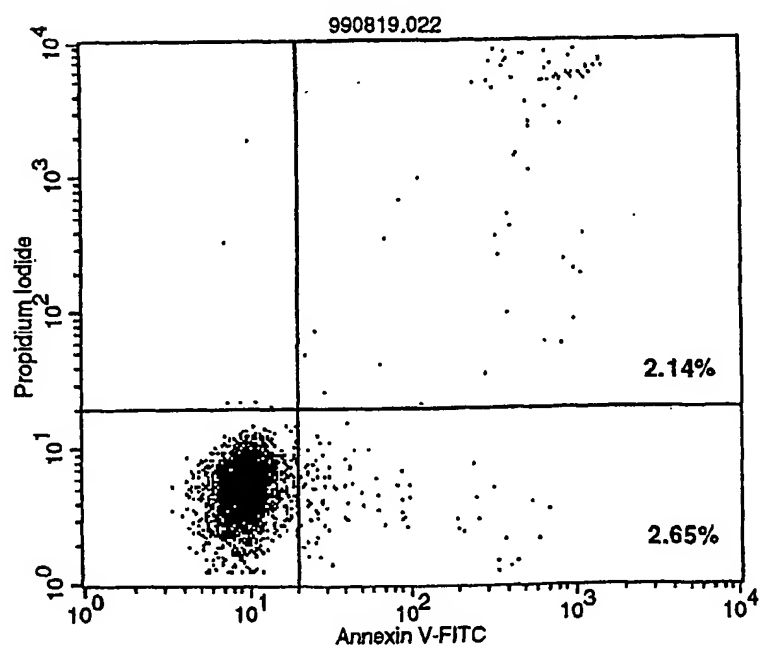
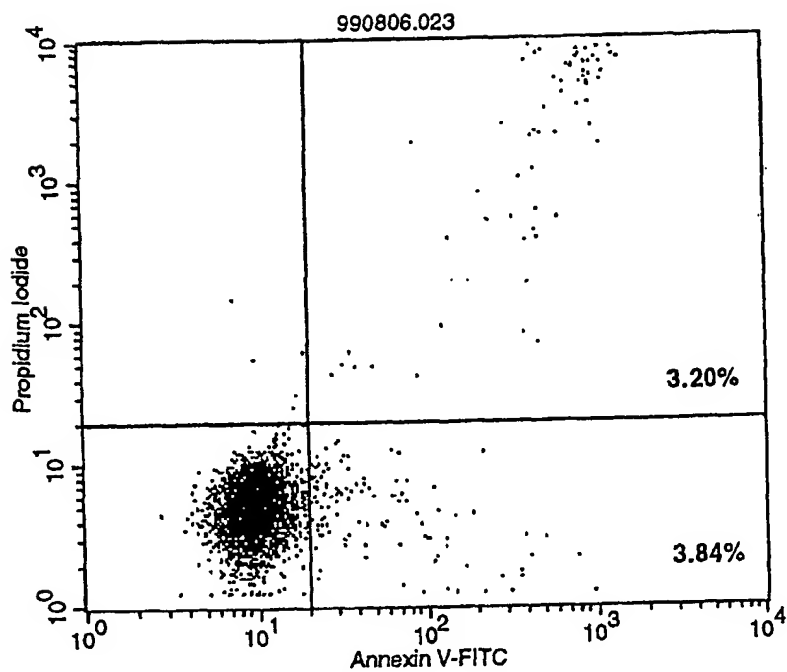


図 28



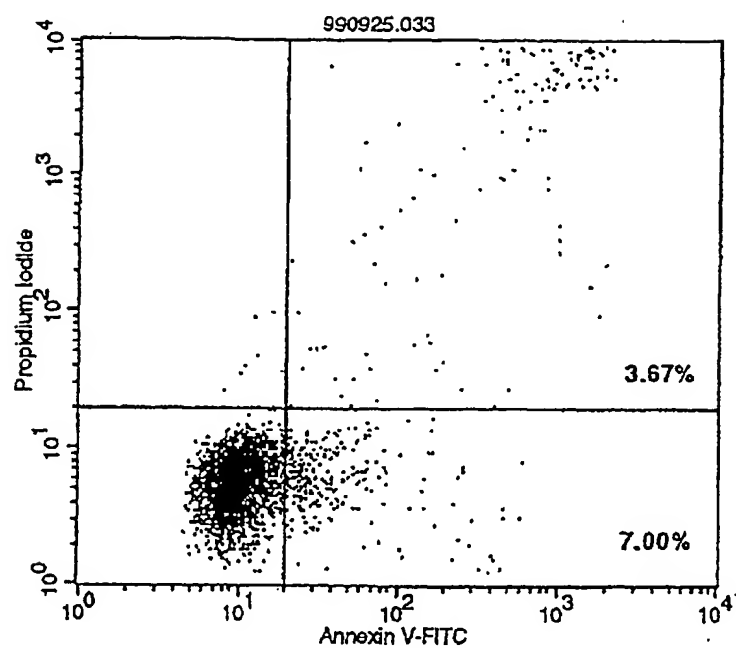
21/38

29

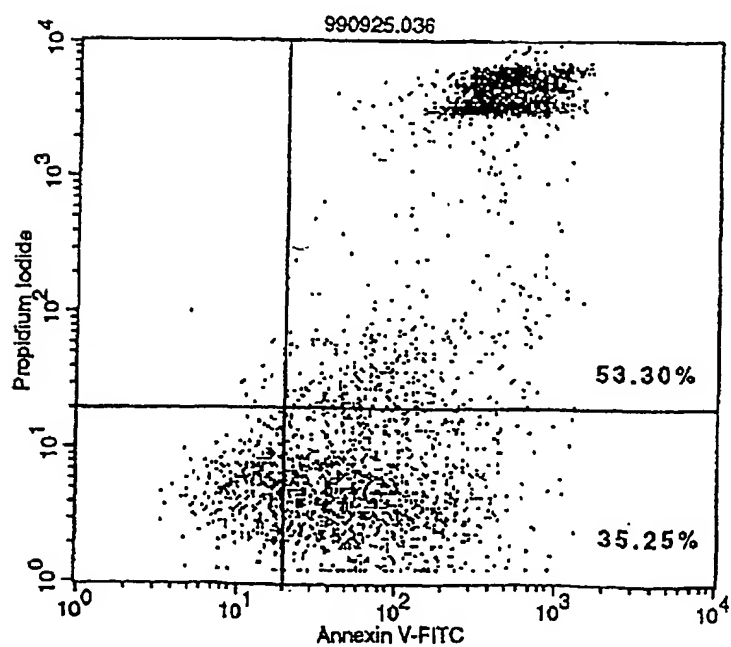


22/38

3 0



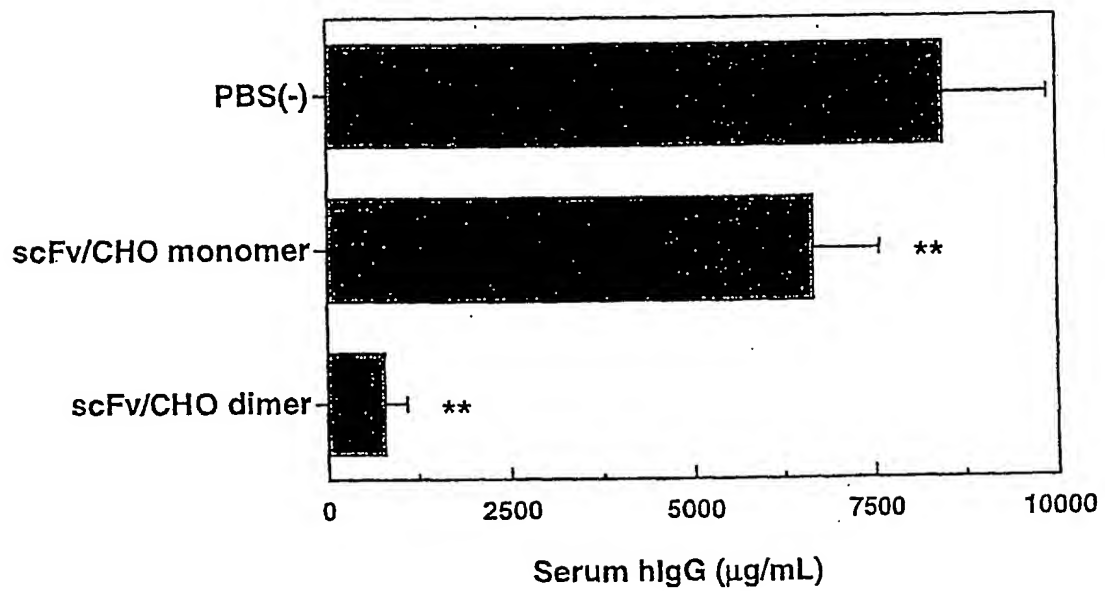
3 1



23/38

図 32

*Effect of MABL-2 (scFv) on serum hlgG
in KPMM2 i.v. SCID mice*

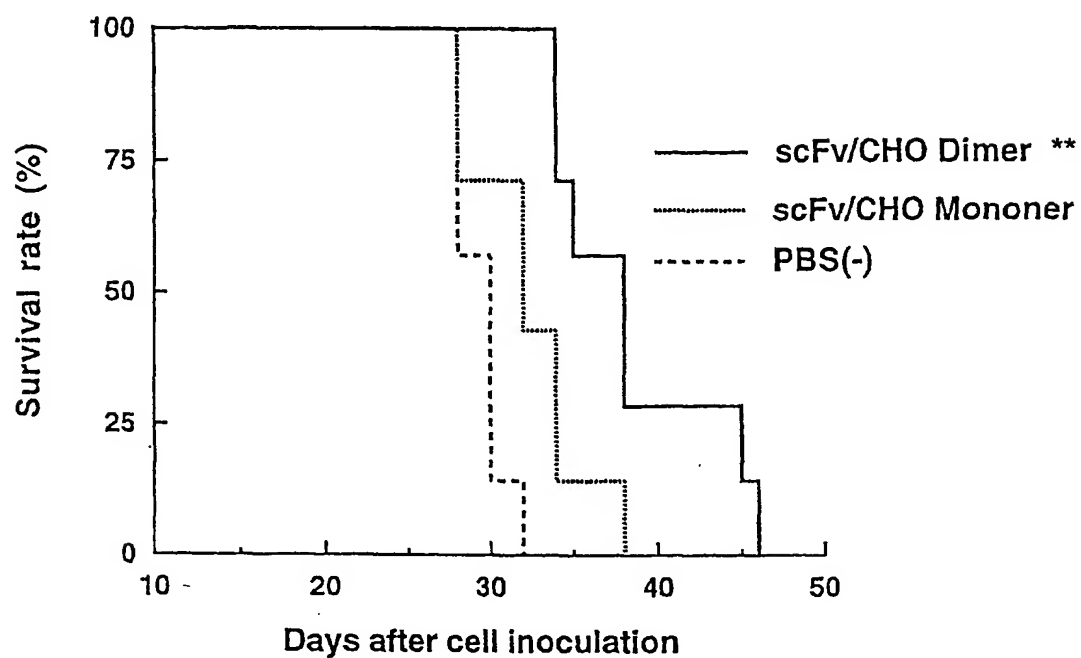


** : $p < 0.01$

24/38

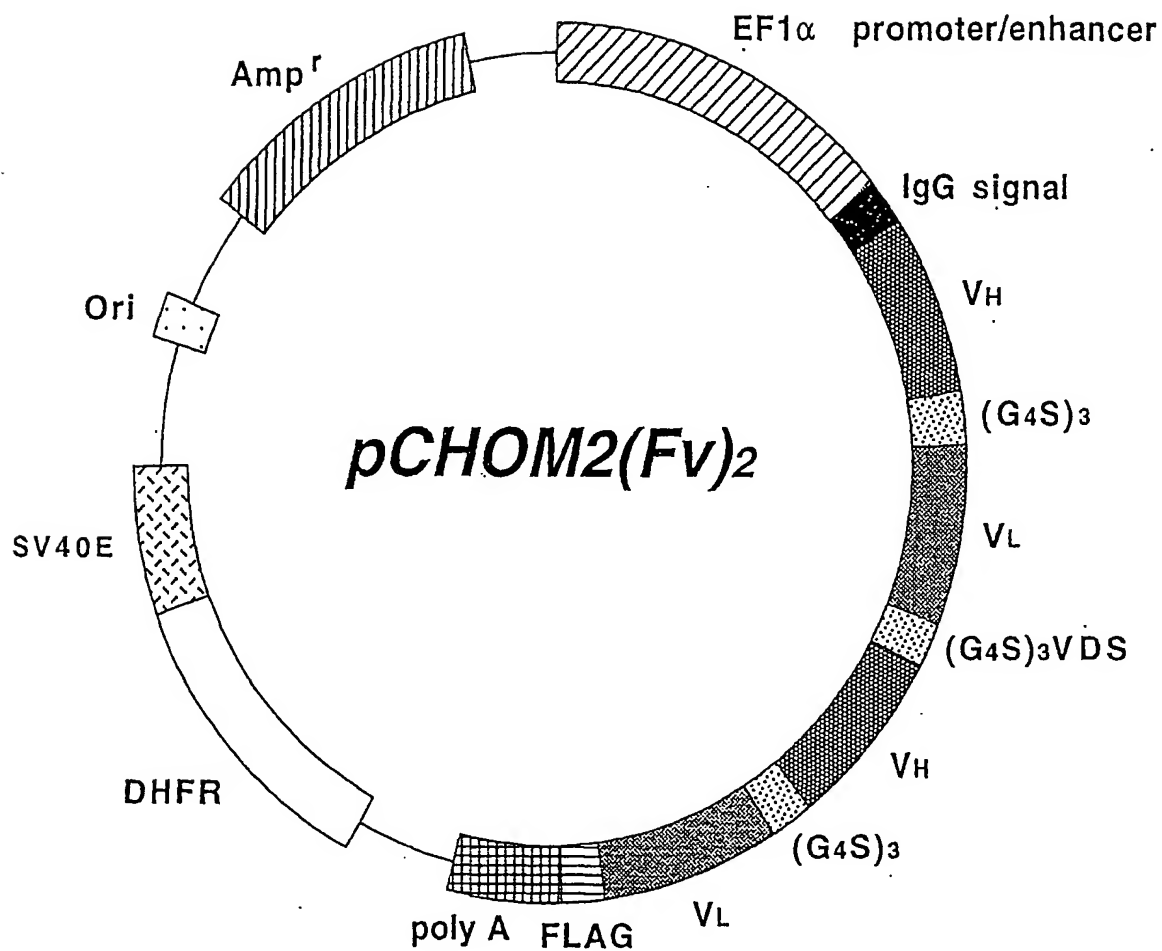
33

*Effect of MABL-2 (scFv) on survival
of KPMM2 i.v. SCID mice*



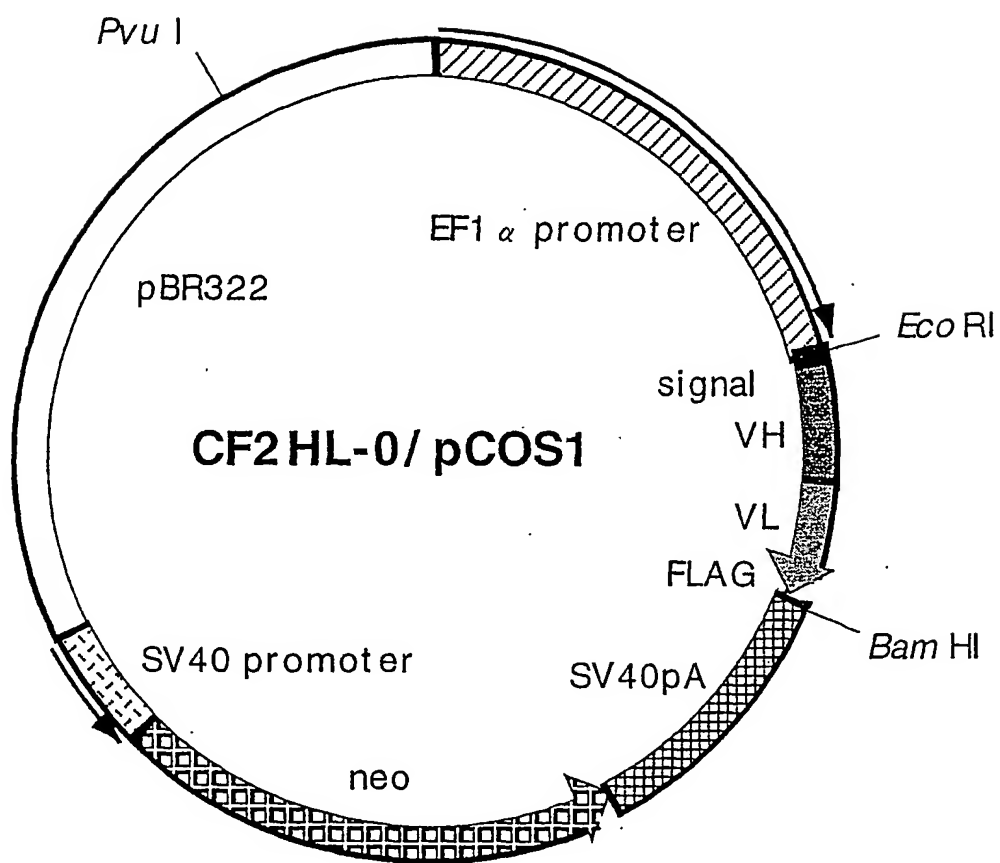
** ; $P < 0.01$ by t-test

図 34



26/38

图 35



27/38

図 36

<HLタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

| Heavy chain | | linker | | Light chain | | |
|-----------------|--|--------|--|-----------------|--|------|
| ... gtc tcg agt | | | | gac gtc gtg ... | | FLAG |
| V S S | | | | D V V | | |

| Plasmid | Number of linker amino acid | linker | |
|---------------|--------------------------------|--|----------------------|
| CF2HL-0/pCOS1 | 0 | gtc tcg agt V S S | gac gtc gtg D V V |
| CF2HL-3/pCOS1 | 3 | gtc tcg agt ggt ggt tcc V S S G G S | gac gtc gtg D V V |
| CF2HL-4/pCOS1 | 4 | gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc V S S G G G S | gac gtc gtg D V V |
| CF2HL-5/pCOS1 | 5 | gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G S | gac gtc gtg D V V |
| CF2HL-6/pCOS1 | 6 | gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G S | gac gtc gtg D V V |
| CF2HL-7/pCOS1 | 7 | gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G G S | gac gtc gtg D V V |

28/38

37

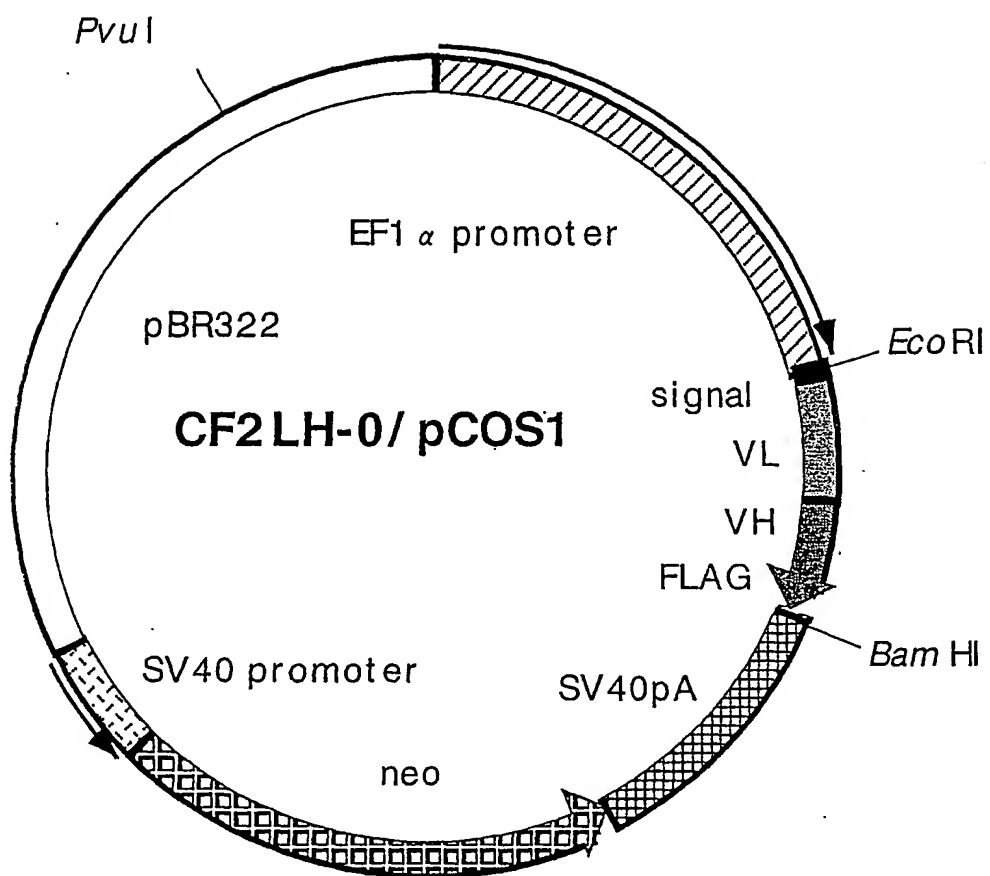
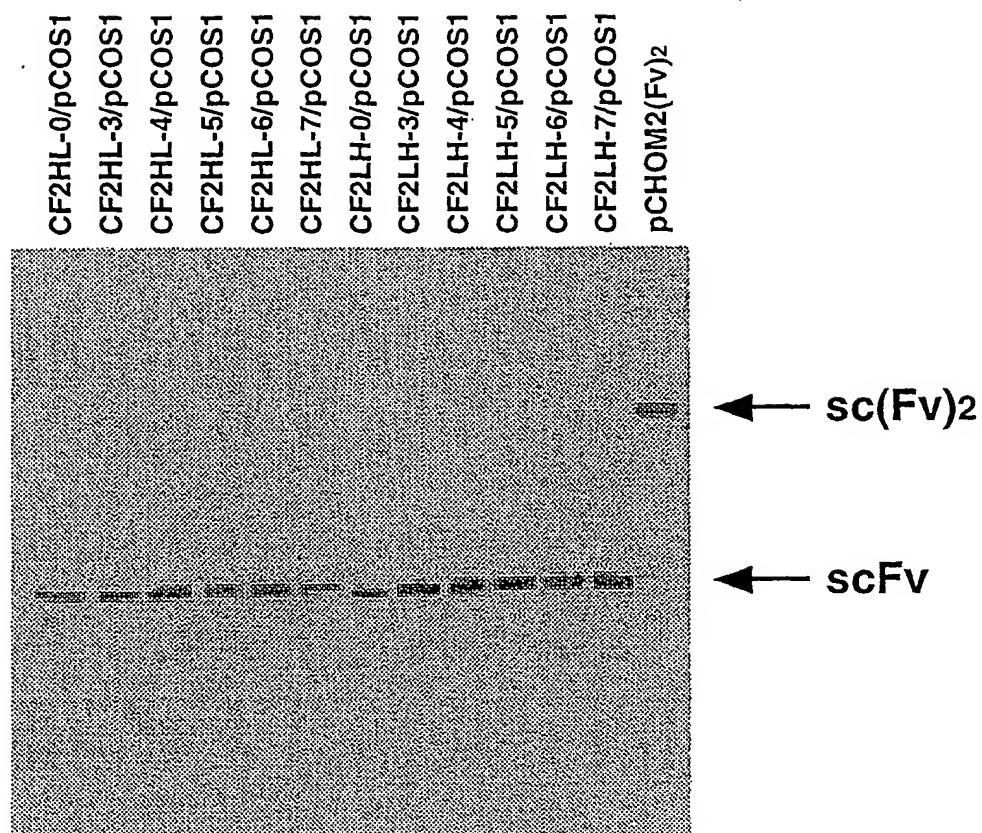


図 38

<LHタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

| Light chain | | Heavy chain | |
|---------------|--------------------------------|---|-----------------|
| ... | gag ata aaa | linker | cag gtc caa ... |
| | E I K | | Q V Q |
| | | | FLAG |
| Plasmid | Number of linker amino acid | linker | |
| CF2LH-0/pCOS1 | 0 | gag ata aaa | cag gtc caa |
| | | E I K | Q V Q |
| CF2LH-3/pCOS1 | 3 | gag ata aaa tcc gga ggc | cag gtc caa |
| | | E I K S G G | Q V Q |
| CF2LH-4/pCOS1 | 4 | gag ata aaa tcc gga ggt ggc | cag gtc caa |
| | | E I K S G G G | Q V Q |
| CF2LH-5/pCOS1 | 5 | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc | cag gtc caa |
| | | E I K S G G G G | Q V Q |
| CF2LH-6/pCOS1 | 6 | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc | cag gtc caa |
| | | E I K S G G G G G | Q V Q |
| CF2LH-7/pCOS1 | 7 | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc | cag gtc caa |
| | | E I K S G G G G G G | Q V Q |

39



☒ 40 a

31/38

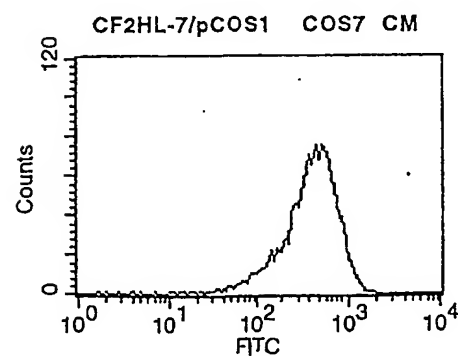
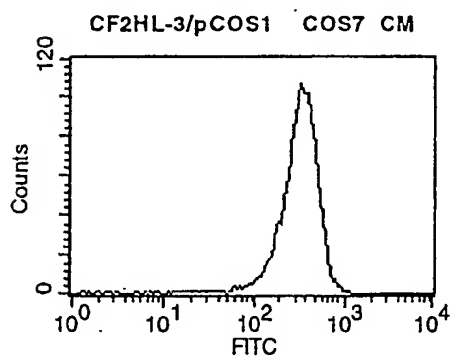
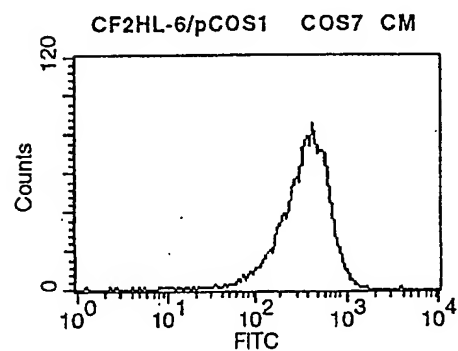
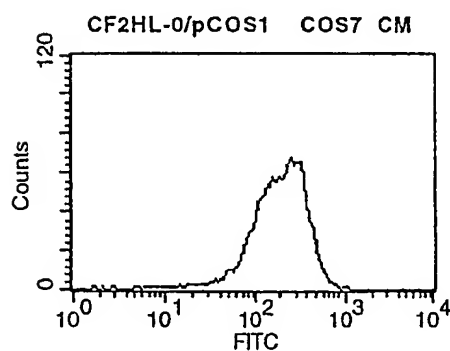
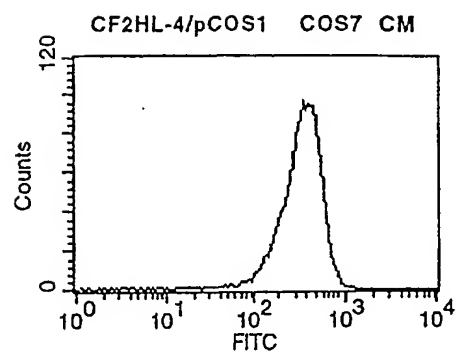
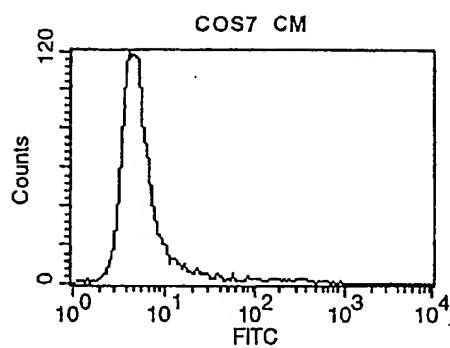
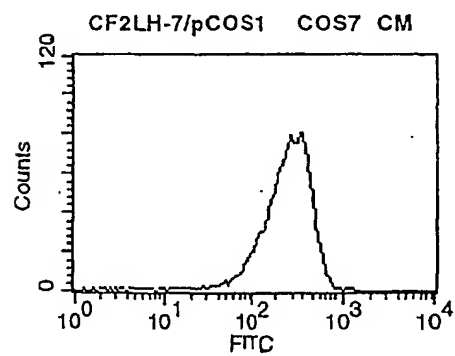
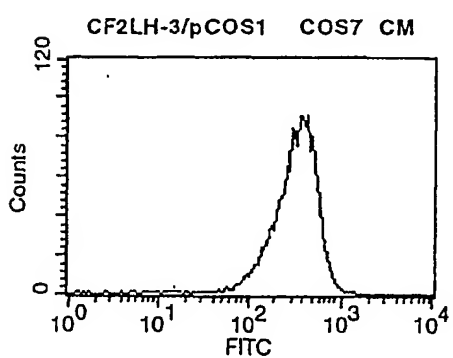
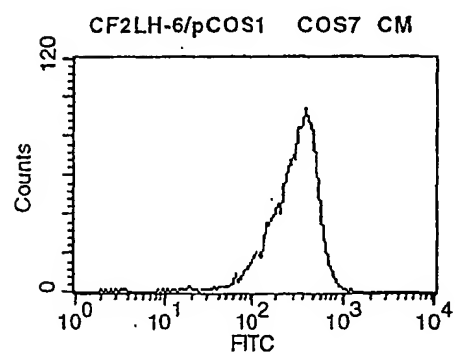
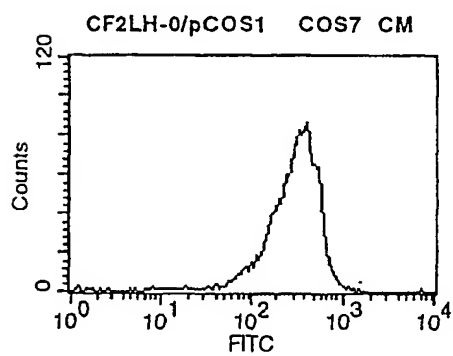
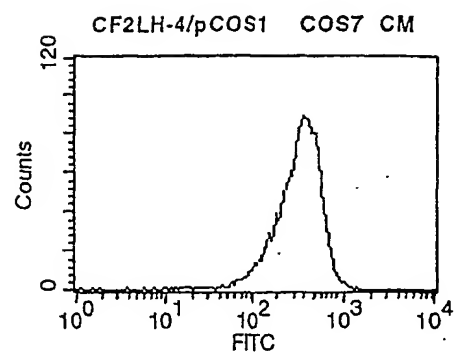
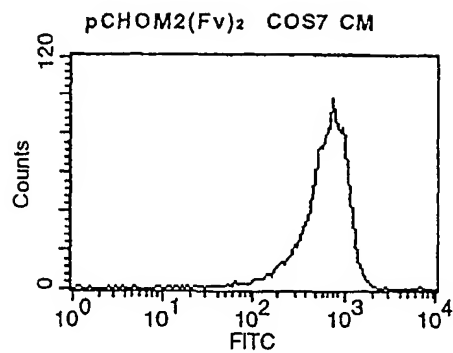


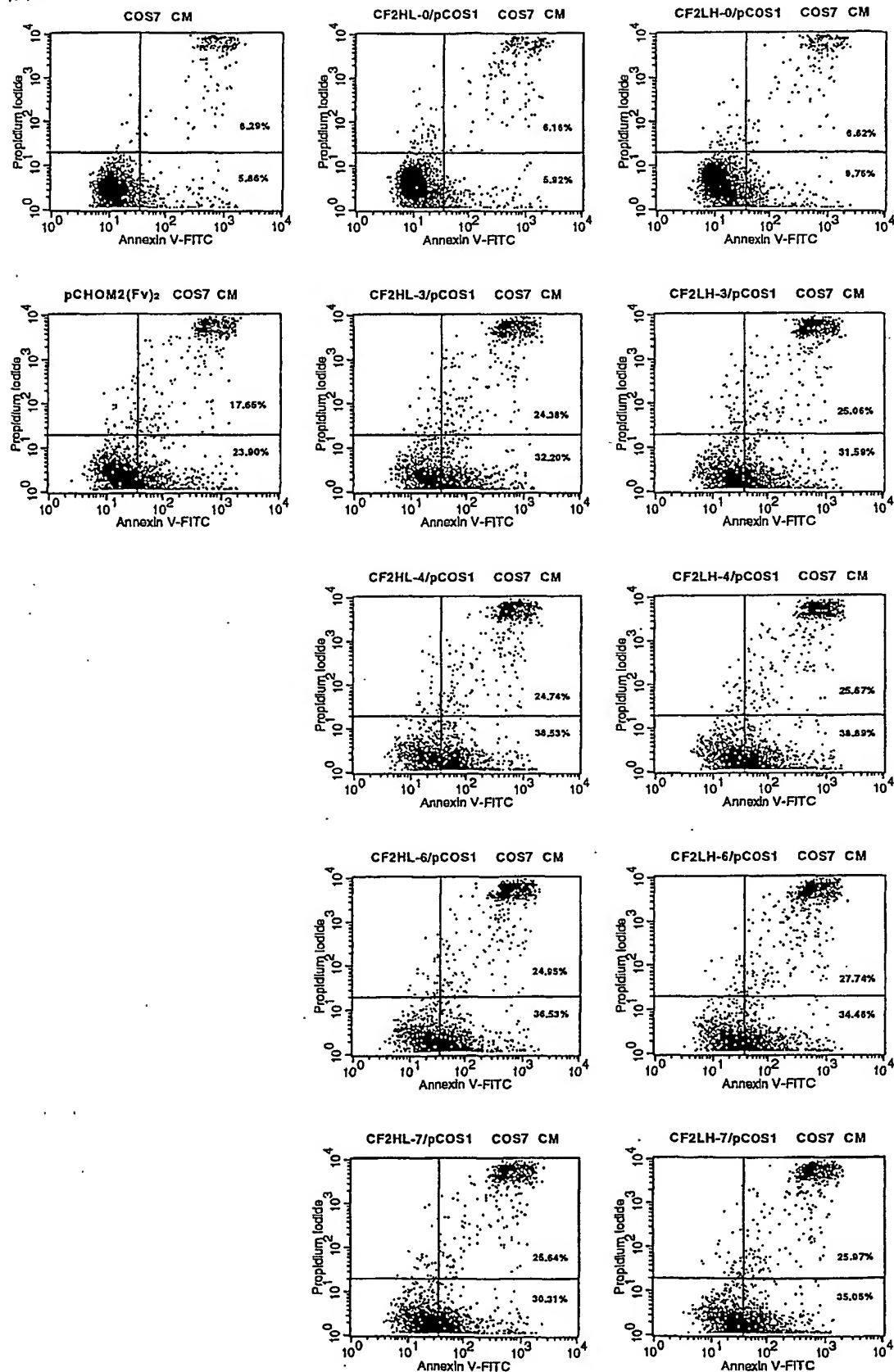
FIG 40 b

32/38



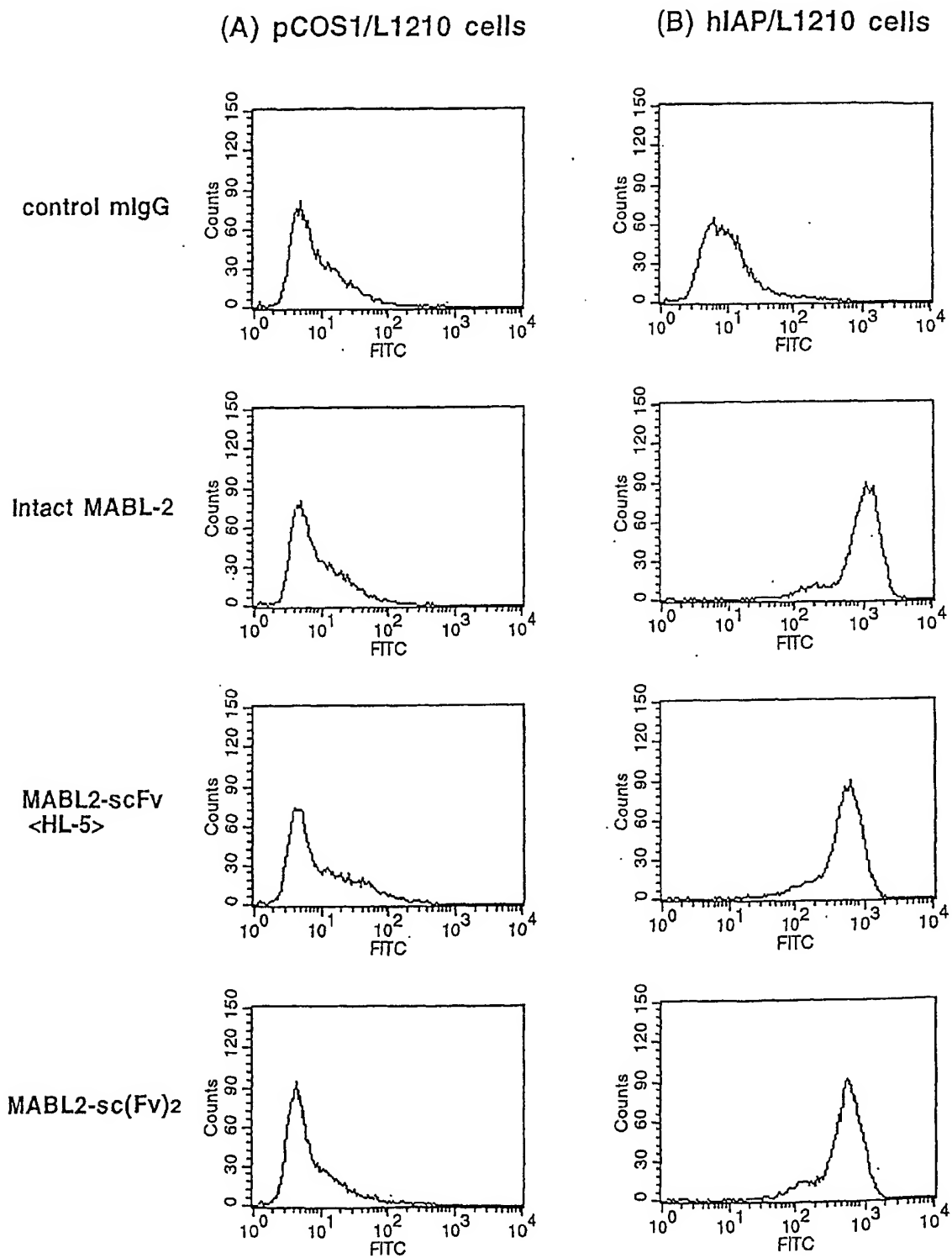
41

33/38



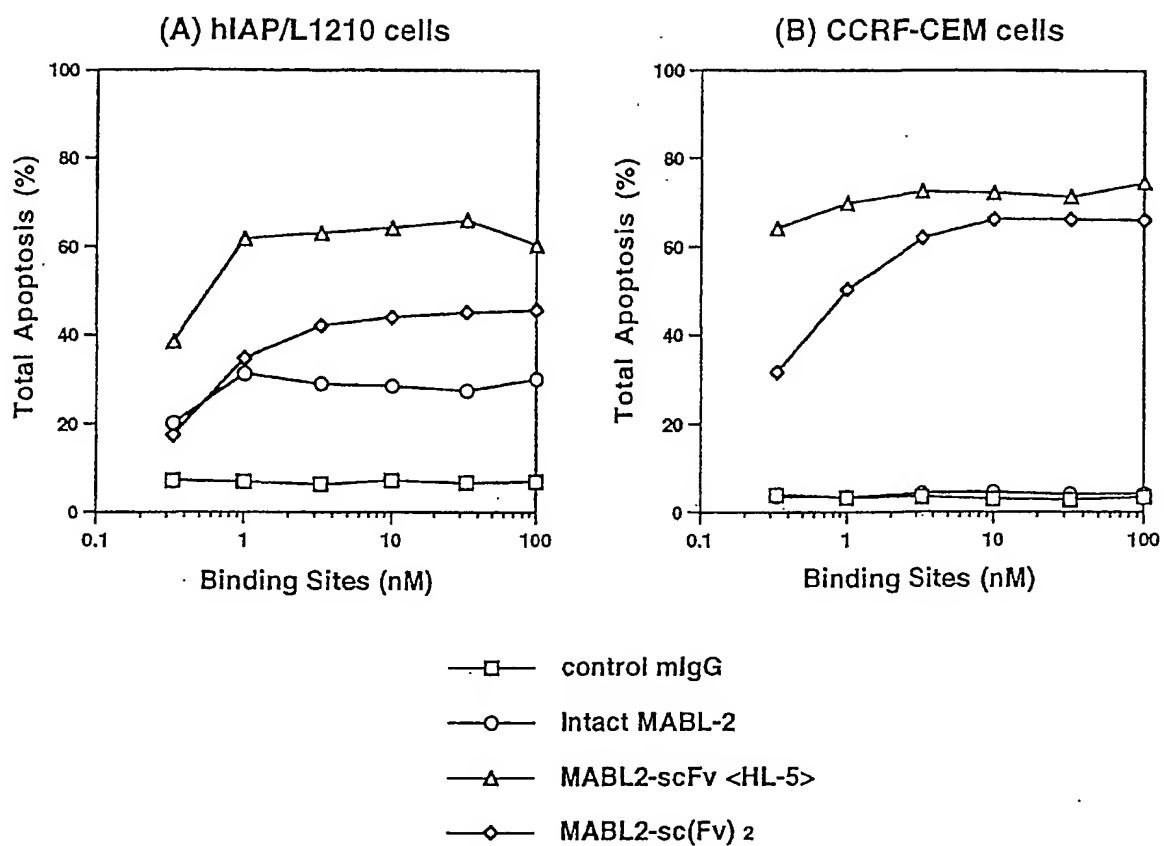
42

34/38



35/38

43



36/38

4 4

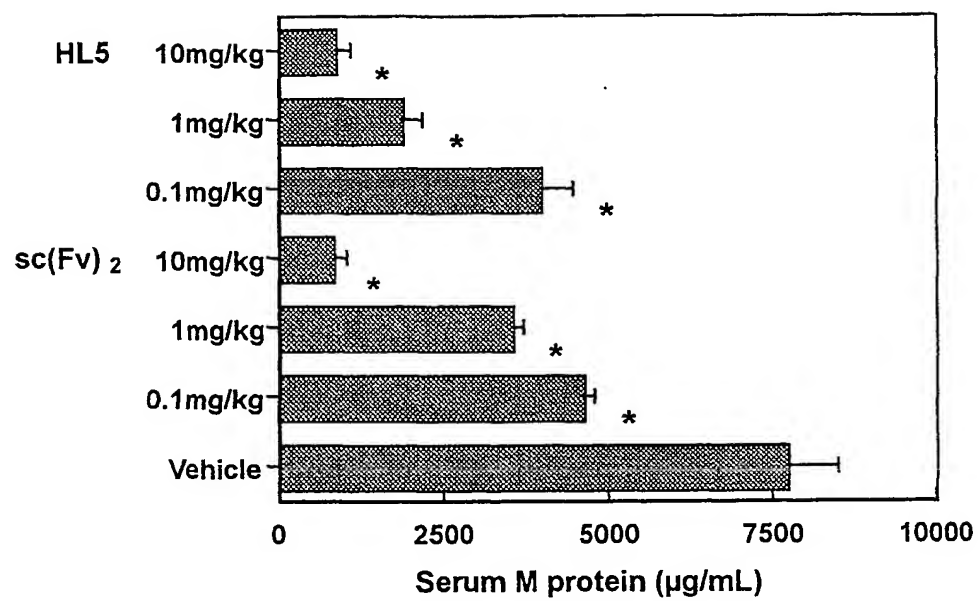
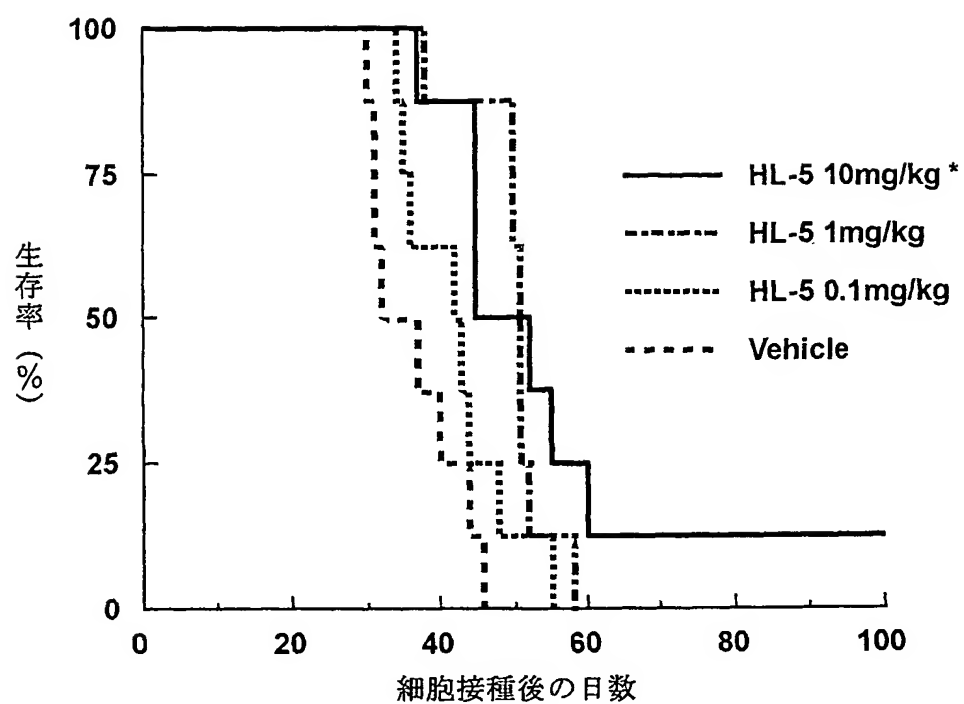
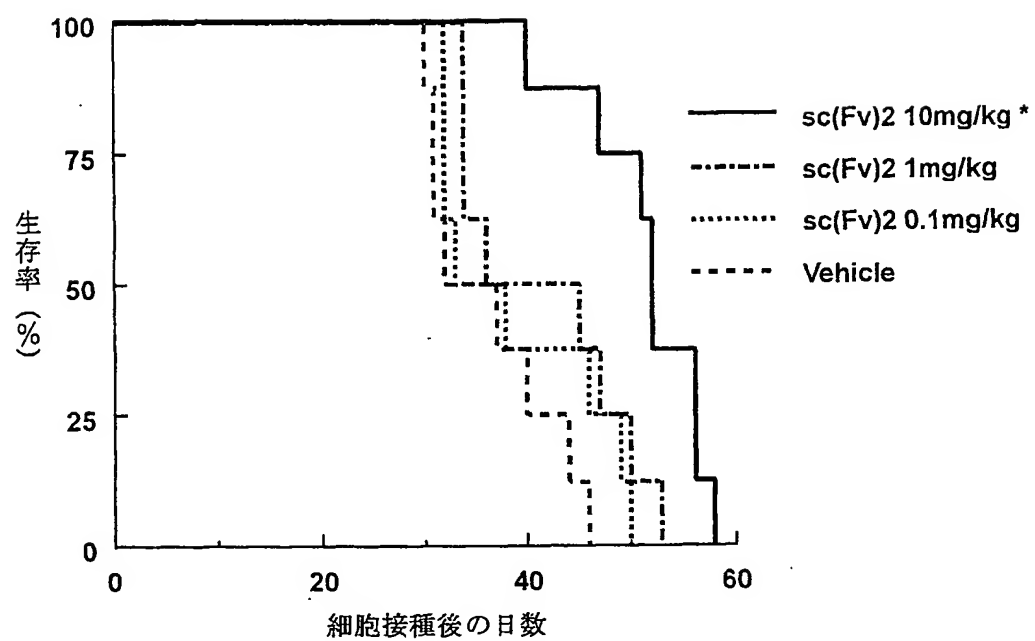


図 4 5



38/38

図 4 6



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Apoptosis-inducible polypeptide

<130> FOP-415

<141> 2001-3-12

<150> US 09/523, 095

<151> 2000-3-10

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<160> 54

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

ccatcctaatacgactcactatagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ggatcccggg tggatgggtg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

3/41

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

```
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro
      5              10              15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90
Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
      20              25              30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
      35              40              45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180
Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
      50              55              60

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
      65              70              75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
      80              85              90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
      95              100             105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
      110             115             120
```

4/41

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggc gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

5/41

ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca g 409

Ser

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M2L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5

10

15

ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90

6/41

Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
20 25 30
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
35 40 45
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
50 55 60
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
65 70 75
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
80 85 90
tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315
Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
95 100 105
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
110 115 120
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
125 130

<210> 8

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

7/41

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggg gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggg act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

8/41

110 115 120
tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
125 130 135
tca g 409
Ser

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggatcca ctcacgtttt atttcagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cgcggatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10/41

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccoga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

11/41

<223> PCR primer

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc tttgtagtct tttatttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 19

ggg ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

12/41

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (826)

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

```
atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
      5              10              15
gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
      20              25              30
cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135
Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
      35              40              45
gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys
      50              55              60
cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225
Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
      65              70              75
tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270
Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
      80              85              90
aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315
Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu
      95              100             105
agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
```


13/41

| | | |
|---|-----|-----|
| 110 | 115 | 120 |
| ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405 | | |
| Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu | | |
| 125 | 130 | 135 |
| aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450 | | |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly | | |
| 140 | 145 | 150 |
| ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495 | | |
| Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu | | |
| 155 | 160 | 165 |
| cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540 | | |
| Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser | | |
| 170 | 175 | 180 |
| cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585 | | |
| Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr | | |
| 185 | 190 | 195 |
| cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630 | | |
| Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val | | |
| 200 | 205 | 210 |
| tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675 | | |
| Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly | | |
| 215 | 220 | 225 |
| tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720 | | |
| Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu | | |
| 230 | 235 | 240 |
| gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765 | | |
| Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr | | |
| 245 | 250 | 255 |

14/41

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

15/41

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga.tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5

10

15

ggg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggg act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

16/41

| | | |
|---|-----|-----|
| 110 | 115 | 120 |
| tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405 | | |
| Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser | | |
| 125 | 130 | 135 |
| tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450 | | |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly | | |
| 140 | 145 | 150 |
| tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495 | | |
| Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser | | |
| 155 | 160 | 165 |
| ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540 | | |
| Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu | | |
| 170 | 175 | 180 |
| cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585 | | |
| Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys | | |
| 185 | 190 | 195 |
| cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630 | | |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg | | |
| 200 | 205 | 210 |
| TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675 | | |
| Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr | | |
| 215 | 220 | 225 |
| gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720 | | |
| Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly | | |
| 230 | 235 | 240 |
| gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765 | | |
| Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly | | |
| 245 | 250 | 255 |

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260

265

270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

50

55

60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

18/41

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
 65 70 75
 tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270
 Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 80 85 90
 act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315
 Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu
 95 100 105
 agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360
 Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 110 115 120
 ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
 Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 125 130 135
 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcc ggt ggt ggt ggt tcc ggt 450
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 140 145 150
 ggt ggc gga tcc gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495
 Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 155 160 165
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 170 175 180
 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 185 190 195
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

19/41

| | | | |
|---|-----|-----|--|
| 200 | 205 | 210 | |
| tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga | 675 | | |
| Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly | | | |
| 215 | 220 | 225 | |
| tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag | 720 | | |
| Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu | | | |
| 230 | 235 | 240 | |
| gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac | 765 | | |
| Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac | 810 | | |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| gat gac gat aaa taa tga | 828 | | |
| Asp Asp Asp Lys | | | |

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

<400> 25

| | |
|---|----|
| atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca | 45 |
| Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr | |

5

10

15

20/41

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

140

145

150

tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495

21/41

Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly
 245 250 255
 ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 260 265 270
 aaa taa tga 819
 Lys

<210> 26

<211> 456

22/41

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (450)

<223> pCHO-shIAP. Soluble human IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tgc gcg tgc tgc 45

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys

5 10 15

gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90

Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe

20 25 30

acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135

Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn

35 40 45

atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180

Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe

50 55 60

aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225

Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser

65 70 75

act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270

Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln

80 85 90

tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315

Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala

95 100 105

23/41

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360

Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr

110

115

120

aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405

Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser

125

130

135

tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450

Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

140

145

150

tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

24/41

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5 10 15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20 25 30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35 40 45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50 55 60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65 70 75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu

80 85 90

25/41

gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr

95 100 105

gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360

Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly

110 115 120

ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggc gga tcg gat gtt 405

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val

125 130 135

gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp

140 145 150

caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495

Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

155 160 165

aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

170 175 180

tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

185 190 195

gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr

200 205 210

ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675

Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe

215 220 225

tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720

26/41

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

230

235

240

aag ctg gaa ata aaa taa tga 741

Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

cgcgctgacc gatccgccac caccggaacc accaccaccc gaaccaccac caccitttat 60

ttccagcttg gt

72

<210> 32

<211> 1605

<212> DNA

<213> Mus

27/41

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

<223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

<400> 32

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
      5              10              15
ggg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
      20              25              30
gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
      35              40              45
tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
      50              55              60
ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
      65              70              75
ggg act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
      80              85              90
tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
      95              100             105
gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

```

28/41

| | | | |
|---|-----|-----|--|
| 110 | 115 | 120 | |
| tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc | 405 | | |
| Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser | | | |
| 125 | 130 | 135 | |
| tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga | 450 | | |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly | | | |
| 140 | 145 | 150 | |
| tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt | 495 | | |
| Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser | | | |
| 155 | 160 | 165 | |
| ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt | 540 | | |
| Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu | | | |
| 170 | 175 | 180 | |
| gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag | 585 | | |
| Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys | | | |
| 185 | 190 | 195 | |
| cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga | 630 | | |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg | | | |
| 200 | 205 | 210 | |
| ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca | 675 | | |
| Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr | | | |
| 215 | 220 | 225 | |
| gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga | 720 | | |
| Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly | | | |
| 230 | 235 | 240 | |
| gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga | 765 | | |
| Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |

29/41

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg 855
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu
 275 280 285
 cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag 900
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 290 295 300
 atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att 945
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile
 305 310 315
 cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 990
 His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 320 325 330
 tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc 1035
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 335 340 345
 aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 1080
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
 350 355 360
 tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat 1125
 Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 365 370 375
 tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 1170
 Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln
 380 385 390
 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215

30/41

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 395 400 405
 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 410 415 420
 cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
 425 430 435
 tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
 440 445 450
 tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395
 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 455 460 465
 atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440
 Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 470 475 480
 agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg
 485 490 495
 gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530
 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr
 500 505 510
 cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575
 His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 515 520 525
 gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tgaggaattc ccaccatggg atg 33

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

32/41

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

gcaattggac ctgttttata tcgagcttgg tccccctcc.gaacgt 46

33/41

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32

<210> 42

34/41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

cagtctcgag tgggtggtcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cagtctcgag tgggtggtggt tccgacgtcg tgatgaccca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

cagtctcgag tgggtggtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

<210> 45

<211> 49

35/41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

<211> 780

<212> DNA

36/41

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv<HL-0>

<400> 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5 10 15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20 25 30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35 40 45 50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55 60 65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70 75 80 85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90 95 100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

105 110 115

tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408

37/41

Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 120 125 130 135
 gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459
 Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 140 145 150
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly
 155 160 165 170
 aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561
 Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 175 180 185
 ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612
 Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 190 195 200
 ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663
 Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala
 205 210 215 220
 gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 225 230 235
 ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 240 245 250 255
 aaa taa tga gga tcc 780
 Lys

<210> 49

<211> 45

38/41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

<211> 54

<212> DNA

39/41

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggctc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tgggtggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

5

10

15

agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102

40/41

Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 20 25 30
 gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 35 40 45 50
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 55 60 65
 aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 70 75 80 85
 ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val
 90 95 100
 gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro
 105 110 115
 tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln
 120 125 130 135
 cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys
 140 145 150
 aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln
 155 160 165 170
 aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561
 Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

41/41

175 180 185
ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp
190 195 200
aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663
Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
205 210 215 220
tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp
225 230 235
ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
240 245 250 255
aaa taa tga gga tcc 780
Lys

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/03, A61P35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/03, A61P35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)

SwissProt/PIR/Geneseq

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| PX | WO, 00/53634, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 September, 2000 (14.09.00), Claims; Figs. 4 to 6; working example 5 (Family: none) | 1-16 |
| X | WO, 99/12973, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18 March, 1999 (18.03.99), Figs. 23, 24, 27 to 29; working examples 4, 5 | 1, 2, 12-15 |
| Y | & AU, 9890028, A1 & JP, 11-155569, A & EP, 1035132, A1 | 3-11, 16 |
| X | Mateo, V. et al., "CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia", | 1, 2, 12-15 |
| Y | Nature Medicine, (November, 1999), Vol. 5, No. 11, pages 1277 to 1284 abstract; page 1279, left column, line 6 to right column, line 3; Fig. 3 | 3-11, 16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 May, 2001 (18.05.01)Date of mailing of the international search report
29 May, 2001 (29.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01912

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Petersen, R. D. et al., "CD47 signals T cell death", J. Immunol. (15 June, 1999), Vol. 162, No. 12, pages 7031-7040 abstract; page 7032, right column, Par. No. [0002] to page 7033, left column, Par. No. [0001] | 1-16 |
| Y | US, 4946778, A (Genex Corporation), 07 August, 1990 (07.08.90), Full text & US, 5260203, A & US, 5455030, A & US, 5869620, A & US, 5518889, A & US, 5534621, A | 1-16 |
| A | EP, 903149, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 24 March, 1999 (24.03.99), Claims & JP, 9-295999, A & WO, 97/32601, A1 | 1-16 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/03, A61P35/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K16/18, A61K39/395, A61K38/03, A61P35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)
SwissProt/PIR/Geneseq
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| PX | WO, 00/53634, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14.9月.2000 (14.09.00), 請求の範囲, 図4-6, 実施例5参照, ファミリーなし | 1-16 |
| X | WO, 99/12973, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18.3月.1999 (18.03.99), 図23, 24, 27-29, 実施例4, 5参照 | 1, 2, 12-15 |
| - | | — |
| Y | & AU, 9890028, A1 & JP, 11-155569, A & EP, 1035132, A1 | 3-11, 16 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.05.01

国際調査報告の発送日

29.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X — Y | Mateo, V. et al., 'CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia' Nature Medicine (1999 Nov), Vol. 5, No. 11, pp. 1277-84 要約, 第1279頁左欄第6行-右欄第3行, 図3参照 | 1, 2, 12-15 — 3-11, 16 |
| Y | Pettersen, R. D. et al., 'CD47 signals T cell death' J. Immunol. (1999 Jun 15) Vol. 162, No. 12, pp. 7031-40 要約, 第7032頁右欄第2段落-第7033頁左欄第1段落参照 | 1-16 |
| Y | US, 4946778, A (Genex Corp.), 7.8月.1990 (07.08.90), 全文参照 & US, 5260203, A & US, 5455030, A & US, 5869620, A & US, 5518889, A & US, 5534621, A | 1-16 |
| A | EP, 903149, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 24.3月.1999 (24.03.99), 請求の範囲参照 & JP, 9-295999, A & WO, 97/32601, A1 | 1-16 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.